



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 105683215 B

(45) 授权公告日 2021.04.23

(21) 申请号 201480036288.6
(22) 申请日 2014.06.25
(65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 105683215 A
(43) 申请公布日 2016.06.15
(66) 本国优先权数据
 201310263384.1 2013.06.26 CN
(85) PCT国际申请进入国家阶段日
 2015.12.24
(86) PCT国际申请的申请数据
 PCT/CN2014/080773 2014.06.25
(87) PCT国际申请的公布数据
 W02014/206304 ZH 2014.12.31
(73) 专利权人 香雪生命科学技术(广东)有限公司
 地址 519031 广东省珠海市横琴新区环岛
 东路3000号2715办公
(72) 发明人 李懿
(74) 专利代理机构 上海一平知识产权代理有限公司 31266
 代理人 陈详 刘妍珺
(51) Int.Cl.
 C07K 14/725 (2006.01)
 C12N 15/12 (2006.01)
 A61K 38/17 (2006.01)
 A61P 35/00 (2006.01)
(56) 对比文件
 CN 102272153 A, 2011.12.07
 CN 102574906 A, 2012.07.11
 WO 2005116075 A1, 2005.12.08
 WO 2007106894 A2, 2007.09.20
 CN 103097407 A, 2013.05.08
 审查员 薛旸
 权利要求书2页 说明书30页
 序列表44页 附图24页

(54) 发明名称

高稳定性的T细胞受体及其制法和应用

(57) 摘要

本发明提供了一种高稳定性的T细胞受体, 所述T细胞受体在其疏水芯区域发生了突变, 引起了其稳定性的提高。本发明还提供了所述T细胞受体的制备方法和应用。

1. 一种具有癌症抗原MAGE A3 HLA A1特异性的T细胞受体 (TCR), 其特征在于:
 - (i) 所述TCR的疏水芯发生突变; 并且
 - (ii) 所述TCR的稳定性高于其对应的疏水芯为野生型的TCR;所述TCR的 α 链可变域与 β 链可变域氨基酸序列分别如SEQ ID NO:9和11所示; 并且所述TCR的 α 链可变域包含选自下组的一个或多个氨基酸残基: 19V; 21I; 91L; 和94I; 和所述TCR的 β 链可变域包含选自下组的一个或多个氨基酸残基: 13V; 89L; 91F或91I; 94V; 和 β 链J基因倒数第4位为M;
其中氨基酸序列位置编号按IMGT中列出的位置编号;
所述TCR是由一柔性肽链连接TCR的 α 与 β 链的可变域而构成的单链TCR。
2. 如权利要求1所述的T细胞受体, 其特征在于, 所述TCR的 α 链可变域包含19V和21I; 所述TCR的 β 链可变域包含91I。
3. 如权利要求1所述的T细胞受体, 其特征在于, 所述TCR的CDR区与野生型TCR的CDR区相同, 或含有导致亲和力上升的突变。
4. 如权利要求1所述的T细胞受体, 其特征在于, 所述的T细胞受体是可溶性的。
5. 如权利要求1所述的T细胞受体, 其特征在于, 所述的T细胞受体包括 (a) 除跨膜结构域以外的全部或部分TCR α 链; 以及 (b) 除跨膜结构域以外的全部或部分TCR β 链;
并且 (a) 和 (b) 各自包含功能性可变结构域, 或包含功能性可变结构域和所述TCR链恒定结构域的至少一部分。
6. 如权利要求1所述的TCR, 其特征在于, 所述TCR在SEQ ID NO:9所示的 α 链可变域的一个或多个下列位点中发生突变: α 链可变区氨基酸第19、21、91、或第94位, 其中氨基酸位置编号按IMGT中列出的位置编号。
7. 如权利要求1所述的TCR, 其特征在于, 所述TCR在SEQ ID NO:11所示的 β 链可变域的一个或多个下列位点中发生突变: β 链可变区氨基酸第13、89、91、或第94位, 和/或 β 链J基因短肽氨基酸倒数第4位, 其中氨基酸位置编号按IMGT中列出的位置编号。
8. 如权利要求1所述的TCR, 其特征在于, 所述TCR包含下列 α 链可变域氨基酸序列之一SEQ ID NO:15、17和107; 和
所述TCR包含下列 β 链可变域氨基酸序列之一SEQ ID NO:16、18和108。
9. 如权利要求1所述的TCR, 其特征在于, 所述TCR的 α 链可变域和 β 链可变域组合选自下列组合之一:
 - (a) α 链可变域氨基酸序列SEQ ID NO:15和 β 链可变域氨基酸序列SEQ ID NO:16;
 - (b) α 链可变域氨基酸序列SEQ ID NO:17和 β 链可变域氨基酸序列SEQ ID NO:18;
 - (c) α 链可变域氨基酸序列SEQ ID NO:15和 β 链可变域氨基酸序列SEQ ID NO:18;和
 - (d) α 链可变域氨基酸序列SEQ ID NO:107和 β 链可变域氨基酸序列SEQ ID NO:108。
10. 如权利要求1所述的TCR, 其特征在于, 所述T细胞受体 α 链可变区疏水芯具有至少一个下列突变: 第19位氨基酸突变为V、第21位氨基酸突变为I、第91位氨基酸突变为L; 和/或 β 链可变区疏水芯具有至少一个下列突变: 第91位氨基酸突变为F或突变为I; 和/或 β 链J基因短肽氨基酸序列倒数第4位氨基酸突变为M。
11. 如权利要求1所述的TCR, 其特征在于, 所述的突变选自下组:

(i) α 链可变区第19位氨基酸突变为V、第21位氨基酸突变为I、第91位氨基酸突变为L, β 链可变区第91位氨基酸突变为F, β 链J基因短肽氨基酸序列倒数第4位突变为M;或

(ii) α 链可变区第19位氨基酸突变为V、第21位氨基酸突变为I, β 链可变区第91位氨基酸突变为I;或

(iii) α 链可变区第19位氨基酸突变为V、第21位氨基酸突变为I、第91位氨基酸突变为L, β 链可变区第91位氨基酸突变为I。

12. 如权利要求5所述的TCR,其特征在于,所述TCR是 $\alpha\beta$ 异质二聚TCR,其具有 α 和 β 链恒定域序列,其半胱氨酸残基在所述TCR的 α 和 β 链恒定域之间形成二硫键。

13. 如权利要求12所述的TCR,其特征在于,半胱氨酸残基在所述TCR的 α 和 β 链恒定域之间形成人工二硫键。

14. 如权利要求1所述的TCR,其特征在于,所述TCR的 α 链和/或 β 链的C-或N-末端结合有偶联物。

15. 如权利要求14所述的T细胞受体,其特征在于,与所述T细胞受体结合的偶联物为可检测标记物、治疗剂、PK修饰部分或任何这些物质的组合。

16. 如权利要求15所述的T细胞受体,其特征在于,与所述T细胞受体结合的治疗剂为连接于所述TCR的 α 或 β 链的C-或N-末端的抗-CD3抗体。

17. 如权利要求1所述的TCR,其特征在于,所述的T细胞受体中的突变是通过噬菌体展示技术筛选出的。

18. 一种核酸分子,其特征在于,所述核酸分子包含编码权利要求1-17中任一所述的TCR或其互补序列。

19. 一种载体,其特征在于,所述的载体含有权利要求18所述的核酸分子。

20. 一种宿主细胞,其特征在于,所述的宿主细胞含有权利要求19所述的载体或染色体中整合有外源的权利要求18所述的核酸分子。

21. 一种制备权利要求1-17任一所述的TCR的方法,其特征在于,包括步骤:

(i) 培养权利要求20所述的宿主细胞,从而表达权利要求1-17所述的TCR;

(ii) 分离或纯化出所述的TCR。

22. 一种T细胞受体复合物,其特征在于,所述的复合物含有一个或多个权利要求1-17中任一所述的TCR。

23. 一种权利要求1-17中任一所述的TCR的用途,其特征在于,用于制备治疗肿瘤的药物。

24. 一种药物组合物,其特征在于,含有药学上可接受的载体以及安全有效量的权利要求1-17中任一所述的TCR。

25. 权利要求22所述的T细胞受体复合物或权利要求24所述的药物组合物的用途,用于制备治疗肿瘤的药物。

26. 一种分离的细胞,其特征在于,其呈递权利要求1所述的TCR。

27. 一种制备权利要求1-17任一所述的TCR的方法,其特征在于,包括步骤:

(i) 对TCR的疏水芯区域引入氨基酸残基突变;和

(ii) 筛选稳定性显著提高的TCR,从而获得权利要求1-17中任一所述的TCR。

高稳定性的T细胞受体及其制法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,更具体地涉及疏水芯区域突变的、高稳定性的可溶性T细胞受体(T cell receptor,TCR)。本发明还涉及所述受体的制备和用途。

背景技术

[0002] 仅仅有两种类型的分子能够以特异性的方式识别抗原。其中一种是免疫球蛋白或抗体;另一种是T细胞受体(TCR),它是由 α 链/ β 链或者 γ 链/ δ 链以异二聚体形式存在的细胞膜表面的糖蛋白。免疫系统的TCR总谱的组成是在胸腺中通过V(D)J重组,然后进行阳性和阴性选择而产生的。在外周环境中,TCR介导了T细胞对主组织相容性复合体-肽复合物(pMHC)的特异性识别,因此其对免疫系统的细胞免疫功能是至关重要的。

[0003] TCR是呈递在主组织相容性复合体(MHC)上的特异性抗原肽的唯一受体,这种外源肽或内源肽可能会是细胞出现异常的唯一迹象。在免疫系统中,通过抗原特异性的TCR与pMHC复合物的结合引发T细胞与抗原呈递细胞(APC)直接的物理接触,然后T细胞及APC两者的其他细胞膜表面分子就发生相互作用,这就引起了一系列后续的细胞信号传递和其他生理反应,从而使得不同抗原特异性的T细胞对其靶细胞发挥免疫效应。

[0004] 在T细胞膜上,TCR与参与信号传导的恒定蛋白CD3结合而形成复合物。TCR以多种形式存在并在结构上相似,然而表达这些TCR的T细胞可存在于不同的解剖学位置并可能具有不同的功能。TCR的胞外部分由两个近膜的恒定结构域和两个远膜的可变结构域组成,所述可变结构域具有与抗体的互补决定区(CDRs)相似的多态环。正是这些环形成了T细胞受体分子的结合位点以及决定了肽特异性。与TCR相对应的MHC I类和II类分子配体也是免疫球蛋白超家族的蛋白质但对于抗原的呈递具有特异性,它们具有多态的肽结合位点,这些位点使它们能够呈递各种不同的短肽片段到APC细胞表面。

[0005] 如同免疫球蛋白(抗体)作为抗原识别分子一样,TCR也可以被开发应用于诊断和治疗。然而,很难以(水)可溶形式制备这种由超过一种多肽亚基所组成的且同时具有一个跨膜区的蛋白质,因为,在很多情况下,这样的蛋白质通过其跨膜区得以稳定。TCR的情况就是这样,这在科学文献中已经有所反映,有文献描述了截短形式的TCR,它仅仅包含胞外区或者仅仅包含胞外和胞质区,这样的TCR可以被TCR特异性的抗体识别(这表明,被抗体所识别的重组TCR部分已经正确折叠),但是产量并不高,在低浓度时不够稳定和/或不能识别主组织相容性复合体-肽复合物。

[0006] 可溶性TCR有很广泛的用途,它不仅可用于研究TCR-pMHC的相互作用,也可用作检测感染的诊断工具或作为自身免疫病的标志物。类似地,可溶性TCR可以被用来将治疗剂(如细胞毒素化合物或免疫刺激性化合物)输送到呈递特异性抗原的细胞,或者用来抑制T细胞(如那些与自身免疫性肽抗原进行反应的T细胞)。为了这些目的,TCR蛋白的修饰是至关重要的。尤其,在原核或真核生物系统中异源表达TCR是很重要的。

[0007] 一方面,对于在大肠杆菌中表达可溶性TCR而言,当TCR与膜分离时,其不稳定性和蛋白产量低成为用TCR或其片段来开发治疗剂或诊断试剂的主要障碍。为了克服单链TCR

固有的不稳定性,一些文献描述了TCR异二聚体的制备,所述异二聚体具有连接各亚基的天然二硫键(Garboczi,等,(1996),自然(Nature)384(6605):134-41;Garboczi,等,(1996),免疫学杂志(J Immunol)157(12):5403-10;Chang等,(1994),PNAS USA 91:11408-11412;Davodeau等,(1993),生物化学杂志(J.Biol.Chem.)268(21):15455-15460;Golden等,(1997),免疫方法学杂志(J.Imm.Meth.)206:163-169;US专利号6080840)。尽管这样的TCR可以被TCR-特异性的抗体识别,但其仅能在相对高的浓度下显示出对天然配体的识别,提示该识别是不稳定的。

[0008] 另一方面,对于具有原始抗原特异性的TCR的制备,在怎样提高水溶性TCR片段稳定性方面有很多研究,包括:单链TCR可变域(Novotny,等(1991)PNAS USA 88:8646-8650),异质二聚体TCR胞外区域(Garcial等(1996)科学(Science)274:209-219),或这些分子的改良形式(Shusta等(2000)自然生物技术(Nature Biotechnology)18:754-759),Boulter等(2003)蛋白质工程(Protein Engineering)16:707-711)。在这些研究中,Novotny等用柔性肽连接单链可变域来构建TCR,然而在用含水溶性侧链的亲水性残基取代暴露于表面疏水性残基后,才能得到稳定的分子。Shusta等通过在整个分子中引入随机突变然后展示在酵母菌的表面并用流式细胞仪FACS进行筛选的方法,来进一步修饰TCR单链可变域结构。Garcia等构建 α/β TCR2C胞外结构域,其中天然的链间二硫键被保留在结构中。而Boulter等通过引入包埋在两个恒定区之间的一个人工二硫键,来改善 α/β 异二聚体的构建物。

[0009] 利用恒定区之间二硫键的方法,已经被用于噬菌体展示TCR载体,这种载体已用于产生很多高亲和性TCR(Li等(2005)自然生物技术(Nature Biotechnology)34:349-354;Liddy等(2012)自然医学(Nature Medicine)18:980-987)。然而,本发明人研究已经发现,使用这种构建物成功地产生高亲和TCR的机率仍很低,而且很难获得高亲和性且高稳定性的TCR。因此,有必要开发新的方法来制备水溶性的TCR、高亲和性且高稳定性的TCR、及它们的活性片段。

发明内容

[0010] 本发明的目的是提供一种高稳定性的T细胞受体。

[0011] 本发明的另一目的是提供所述高稳定性T细胞受体的制法和用途。

[0012] 在本发明的第一方面,提供了一种T细胞受体(T-cell receptor,TCR),所述T细胞受体具有以下特征:

[0013] (i) 所述TCR的疏水芯区域发生突变;并且

[0014] (ii) 所述TCR的稳定性高于其对应的疏水芯为野生型的TCR。

[0015] 在另一优选例中,所述“突变”是指本发明所述的TCR的疏水芯区域相对于与其对应的野生型的TCR疏水芯区域发生突变。

[0016] 在另一优选例中,所述的“稳定性高于”指出本发明TCR与其对应的疏水芯为野生型的TCR相比,稳定性提高至少5%,较佳地至少30%,更佳地至少80%。

[0017] 在另一优选例中,所述的“野生型的TCR疏水芯”是指与天然产生的TCR中疏水芯氨基酸残基(序列)相同,未发生突变的疏水芯。

[0018] 在另一优选例中,所述的“其对应的疏水芯为野生型的TCR”是指与本发明的疏水芯区域发生突变的TCR相比,除了疏水芯为野生型外,其他区域与本发明TCR相同的TCR。另

外地或较佳地,所述的“其对应的疏水芯为野生型的TCR”指天然产生的,不含任何突变位点的野生型TCR,尤其是其 α 链可变域和 β 链可变域为野生型的sTv分子,代表性的例子包括LC13-WT。

[0019] 在另一优选例中,所述TCR的CDR区与野生型相同,或含有导致亲和力上升的突变。

[0020] 在另一优选例中,所述的亲和力指该TCR分子与其相应抗原之间的结合亲和力。

[0021] 在另一优选例中,所述的T细胞受体可变区骨架(Framework)和恒定区位置中的侧链指向表面的疏水性残基发生突变。即,所述TCR的可变域骨架和恒定域中暴露于表面的氨基酸残基发生突变。较佳地,所述发生突变的氨基酸残基为TCR的 α 链和/或 β 链可变域中暴露于表面的氨基酸残基。更具体地,所述的可变域中暴露于表面的氨基酸位点包括TCR α 链可变域氨基酸第4位、第12位、第16位、第93位、第97位、第100位、第105位和 α 链J基因倒数第1位和TCR β 链可变域氨基酸第4位、第101位、 β 链J基因倒数第1位和 β 链J基因倒数第3位。其中,氨基酸位置编号按IMGT(国际免疫遗传学信息系统)中列出的位置编号。

[0022] 在另一优选例中,所述的T细胞受体可变区骨架(Framework)侧链指向表面(可变域中暴露于表面)的疏水性残基的突变形式包括(但不限于) α 链:I7S,A9S,A10S,V20S,A92E,A93S,J gene短肽氨基酸位置倒数第二位由I变为T, β 链:I12S,或上述突变的任意组合,其中氨基酸位置编号按IMGT中列出的位置编号。

[0023] 在另一优选例中,所述的T细胞受体是可溶性的。

[0024] 在另一优选例中,所述T细胞受体是膜蛋白。

[0025] 在另一优选例中,所述T细胞受体包括(a)除跨膜结构域以外的全部或部分TCR α 链;以及(b)除跨膜结构域以外的全部或部分TCR β 链;

[0026] 并且(a)和(b)各自包含功能性可变结构域,或包含功能性可变结构域和所述TCR链恒定结构域的至少一部分。

[0027] 在另一优选例中,所述TCR是由一柔性肽链连接TCR的 α 与 β 链的可变域而构成的单链TCR。

[0028] 在另一优选例中,所述的突变中包括至少一个疏水芯位置的突变。

[0029] 在另一优选例中,所述的T细胞受体在以下位置具有一个或多个突变, α 和/或 β 链氨基酸序列可变区疏水芯位置:即可变区氨基酸第11,13,19,21,53,76,89,91,94位,和/或 α 链J基因短肽氨基酸位置倒数第3,5,7位和/或 β 链J基因短肽氨基酸位置倒数第2,4,6位,其中氨基酸位置编号按IMGT(国际免疫遗传学信息系统)中列出的位置编号。

[0030] 在另一优选例中,所述TCR的 α 链可变域在一个或多个下列位点中发生突变: α 链可变区氨基酸第11、13、19、21、53、76、89、91、或第94位,和/或 α 链J基因短肽氨基酸倒数第3位、倒数第5位或倒数第7位,其中氨基酸位置编号按IMGT(国际免疫遗传学信息系统)中列出的位置编号。

[0031] 在另一优选例中,所述TCR在SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:29或SEQ ID NO:31或SEQ ID NO:33所示的 α 链可变域的一个或多个下列位点中发生突变: α 链可变区氨基酸第11、13、19、21、53、76、89、91、或第94位,和/或 α 链J基因短肽氨基酸倒数第3位、倒数第5位或倒数第7位,其中氨基酸位置编号按IMGT中列出的位置编号。

[0032] 在另一优选例中,所述TCR的 β 链可变域在一个或多个下列位点中发生突变: β 链可变区氨基酸第11、13、19、21、53、76、89、91、或第94位,和/或 β 链J基因短肽氨基酸倒数第2

位、倒数第4位或倒数第6位,其中氨基酸位置编号按IMGT中列出的位置编号。

[0033] 在另一优选例中,所述TCR在SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:30或SEQ ID NO:32或SEQ ID NO:34所示的 β 链可变域的一个或多个下列位点中发生突变: β 链可变区氨基酸第11、13、19、21、53、76、89、91、或第94位,和/或 β 链J基因短肽氨基酸倒数第2位、倒数第4位或倒数第6位,其中氨基酸位置编号按IMGT中列出的位置编号。

[0034] 在另一优选例中,所述TCR的 α 链可变域包含选自下组的一个或多个氨基酸残基:11L、11M或11E;13V、13R或13K;19V;21I;91L或91I;94V或94I;和/或所述TCR的 β 链可变域包含选自下组的一个或多个氨基酸残基:11L或11V;13V;19V;89L;91F或91I;94V或94L; β 链J基因倒数第6位为T和 β 链J基因倒数第4位为M;其中氨基酸位置编号按IMGT中列出的位置编号。

[0035] 在另一优选例中,所述TCR的 α 链和/或 β 链可变域中暴露于表面的氨基酸残基发生突变。

[0036] 在另一优选例中,所述TCR包含选自下组的一个或多个 α 链可变域氨基酸残基4L;12N;16S;93N或93R;97N;100G;105S;和 α 链J基因倒数第1位为D,和/或所述TCR包含选自下组的一个或多个 β 链可变域氨基酸残基4I;101L; β 链J基因倒数第1位为D和 β 链J基因倒数第3位为E。

[0037] 在另一优选例中,所述TCR包含下列 α 链可变域氨基酸序列之一SEQ ID NO:15、17、35、37、39、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、97、99、101、103、105和107。

[0038] 在另一优选例中,所述TCR包含下列 β 链可变域氨基酸序列之一SEQ ID NO:16、18、36、38、40、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、98、100、102、104、106和108。

[0039] 在另一优选例中,所述TCR的 α 链可变域和 β 链可变域组合选自下列组合之一:

[0040] (a) α 链可变域氨基酸序列SEQ ID NO:15和 β 链可变域氨基酸序列SEQ ID NO:16;

[0041] (b) α 链可变域氨基酸序列SEQ ID NO:17和 β 链可变域氨基酸序列SEQ ID NO:18;

[0042] (c) α 链可变域氨基酸序列SEQ ID NO:15和 β 链可变域氨基酸序列SEQ ID NO:18;

[0043] (d) α 链可变域氨基酸序列SEQ ID NO:35和 β 链可变域氨基酸序列SEQ ID NO:36;

[0044] (e) α 链可变域氨基酸序列SEQ ID NO:37和 β 链可变域氨基酸序列SEQ ID NO:38;

[0045] (f) α 链可变域氨基酸序列SEQ ID NO:39和 β 链可变域氨基酸序列SEQ ID NO:40;

[0046] (g) α 链可变域氨基酸序列SEQ ID NO:75和 β 链可变域氨基酸序列SEQ ID NO:86;

[0047] (h) α 链可变域氨基酸序列SEQ ID NO:76和 β 链可变域氨基酸序列SEQ ID NO:87;

[0048] (i) α 链可变域氨基酸序列SEQ ID NO:77和 β 链可变域氨基酸序列SEQ ID NO:88;

[0049] (j) α 链可变域氨基酸序列SEQ ID NO:78和 β 链可变域氨基酸序列SEQ ID NO:89;

[0050] (k) α 链可变域氨基酸序列SEQ ID NO:79和 β 链可变域氨基酸序列SEQ ID NO:90;

[0051] (l) α 链可变域氨基酸序列SEQ ID NO:80和 β 链可变域氨基酸序列SEQ ID NO:91;

[0052] (m) α 链可变域氨基酸序列SEQ ID NO:81和 β 链可变域氨基酸序列SEQ ID NO:92;

[0053] (n) α 链可变域氨基酸序列SEQ ID NO:82和 β 链可变域氨基酸序列SEQ ID NO:93;

[0054] (o) α 链可变域氨基酸序列SEQ ID NO:83和 β 链可变域氨基酸序列SEQ ID NO:94;

[0055] (p) α 链可变域氨基酸序列SEQ ID NO:84和 β 链可变域氨基酸序列SEQ ID NO:95;

[0056] (q) α 链可变域氨基酸序列SEQ ID NO:85和 β 链可变域氨基酸序列SEQ ID NO:96;

[0057] (r) α 链可变域氨基酸序列SEQ ID NO:97和 β 链可变域氨基酸序列SEQ ID NO:98;

- [0058] (s) α 链可变域氨基酸序列SEQ ID NO:99和 β 链可变域氨基酸序列SEQ ID NO:100;
- [0059] (t) α 链可变域氨基酸序列SEQ ID NO:101和 β 链可变域氨基酸序列SEQ ID NO:102;
- [0060] (u) α 链可变域氨基酸序列SEQ ID NO:103和 β 链可变域氨基酸序列SEQ ID NO:104;
- [0061] (v) α 链可变域氨基酸序列SEQ ID NO:105和 β 链可变域氨基酸序列SEQ ID NO:106;和
- [0062] (w) α 链可变域氨基酸序列SEQ ID NO:107和 β 链可变域氨基酸序列SEQ ID NO:108。
- [0063] 在另一优选例中,所述T细胞受体 α 链可变区疏水芯具有至少一个下列突变:第19位氨基酸突变为V、第21位氨基酸突变为I、第91位氨基酸突变为L;和/或 β 链可变区疏水芯具有至少一个下列突变:第91位氨基酸突变为F或突变为I;和/或 β 链J基因短肽氨基酸序列倒数第4位氨基酸突变为M。
- [0064] 在另一优选例中,所述的突变选自下组:
- [0065] (i) α 链可变区第19位氨基酸突变为V、第21位氨基酸突变为I、第91位氨基酸突变为L, β 链可变区第91位氨基酸突变为F, β 链J基因短肽氨基酸序列倒数第4位突变为M;或
- [0066] (ii) α 链可变区第19位氨基酸突变为V、第21位氨基酸突变为I, β 链可变区第91位氨基酸突变为I;或
- [0067] (iii) α 链可变区第19位氨基酸突变为V、第21位氨基酸突变为I、第91位氨基酸突变为L, β 链可变区第91位氨基酸突变为I。
- [0068] 在另一优选例中,所述T细胞受体 α 链可变区疏水芯具有至少一个下列突变:L19V、L21I、I91L;和/或 β 链可变区疏水芯具有至少一个下列突变:V91F或V91I;和/或 β 链J基因短肽氨基酸序列倒数第4位由L突变为M。
- [0069] 在另一优选例中,所述的突变选自下组:
- [0070] (i) α 链可变区的L19V、L21I、I91L, β 链可变区的V91F, β 链J基因短肽氨基酸序列倒数第4位由L变为M;或
- [0071] (ii) α 链可变区的L19V、L21I, β 链可变区的V91I;或
- [0072] (iii) α 链可变区的L19V、L21I、I91L, β 链可变区的V91I;
- [0073] 其中氨基酸位置编号按IMGT中列出的位置编号。
- [0074] 在另一优选例中,所述的T细胞受体还具有连接TCR α 链恒定区和 β 链恒定区的二硫键。
- [0075] 在另一优选例中,所述的二硫键是天然TCR中存在的或人工引入的。
- [0076] 在另一优选例中,所述的人工引入的二硫键位于TCR α 与 β 链的恒定结构域之间。
- [0077] 在另一优选例中,所述的人工引入的形成链间二硫键的半胱氨酸残基替换了包括但不限于下列位置中至少一组 α 和 β 链的氨基酸残基:
- [0078] (a) TCR α 链恒定区的第48位T和TCR β 链恒定区的第57位S;或
- [0079] (b) TCR α 链恒定区的第45位T和TCR β 链恒定区的第77位S;或
- [0080] (c) TCR α 链恒定区的第10位T和TCR β 链恒定区的第17位S;或
- [0081] (d) TCR α 链恒定区的第45位T和TCR β 链恒定区的第59位D;或

- [0082] (e) TCR α 链恒定区的第15位S和TCR β 链恒定区的第15位E;或
- [0083] (f) TCR α 链恒定区的第61位S和TCR β 链恒定区的第57位S;或
- [0084] (g) TCR α 链恒定区的第50位L和TCR β 链恒定区的第57位S;或
- [0085] (h) TCR α 链恒定区的第15位S和TCR β 链恒定区的第13位V;或
- [0086] (i) TCR α 链恒定区的第12位L和TCR β 链恒定区的第17位S;或
- [0087] (j) TCR α 链恒定区的第61位S和TCR β 链恒定区的第79位R;或
- [0088] (k) TCR α 链恒定区的第12位L和TCR β 链恒定区的第14位F;或
- [0089] (l) TCR α 链恒定区的第22位V和TCR β 链恒定区的第14位F;或
- [0090] (m) TCR α 链恒定区的第43位Y和TCR β 链恒定区的第63位L;或
- [0091] (n) TCR α 链恒定区的第10位Y和TCR β 链恒定区的第17位S。

[0092] 该处TCR α 链与 β 链恒定区被取代的氨基酸的位置编号按文献“在结晶化及治疗应用中稳定的可溶T细胞受体”(Stable, soluble T-cell receptor molecules for crystallization and therapeutics) (Jonathan M. Boulter等, 2003, 蛋白质工程 (Protein Engineering) 16 (9): 707-711) 里面给出的位置编号。

[0093] 在另一优选例中,所述的T细胞受体是通过噬菌体展示技术筛选出的。

[0094] 在另一优选例中,所述的T细胞受体结合(以共价或其他方式)有偶联物。

[0095] 在另一优选例中,所述偶联物选自下组的一个或多个:

[0096] (1) 可检测标记物;

[0097] (2) 治疗剂;和/或

[0098] (3) PK修饰部分。

[0099] 优选地,所述可检测标记物包括:荧光或发光标记物、放射性标记物、MRI(磁共振成像)或CT(电子计算机X射线断层扫描技术)造影剂、或能够产生可检测产物的酶。

[0100] 优选地,所述治疗剂包括:放射性核素、生物毒素、细胞因子(如IL-2等)、抗体、抗体Fc片段、抗体scFv片段、金纳米颗粒/纳米棒、病毒颗粒、脂质体、纳米磁粒、前药激活酶(例如,DT-心肌黄酶(DTD)或联苯基水解酶-样蛋白质(BPHL))、化疗剂(例如,顺铂)或任何形式的纳米颗粒等。

[0101] 在另一优选例中,所述偶联物为连接于所述TCR的 α 和/或 β 链的C-或N-末端的抗-CD3的抗体。

[0102] 在本发明的第二方面,提供了一种核酸分子,所述核酸分子包含编码本发明第一方面中任一所述的T细胞受体或其互补序列。

[0103] 在本发明的第三方面,提供了一种载体,所述的载体含有本发明第二方面所述的核酸分子。

[0104] 在本发明的第四方面,提供了一种宿主细胞或遗传改造的工程细胞,所述的细胞含有本发明第三方面所述的载体或染色体中整合有外源的本发明第二方面所述的核酸分子。

[0105] 在另一优选例中,所述的宿主细胞选自:原核细胞和真核细胞,例如大肠杆菌、酵母细胞、CHO细胞等。

[0106] 在本发明的第五方面,提供了一种制备本发明第一方面所述的T细胞受体的方法,包括步骤:

- [0107] (i) 培养本发明第四方面所述的宿主细胞,从而表达本发明所述的T细胞受体;
- [0108] (ii) 分离或纯化出所述的T细胞受体。
- [0109] 在本发明的第六方面,提供了一种T细胞受体复合物,其特征在于,所述的复合物含有本发明第一方面中任一所述的T细胞受体。
- [0110] 在另一优选例中,所述的复合物包括本发明的T细胞受体与治疗剂的结合所形成的复合物、或与可检测标记物的结合所形成的复合物。
- [0111] 在另一优选例中,所述的复合物包含2个或多个T细胞受体分子。
- [0112] 在本发明的第七方面,提供了本发明上述所述的T细胞受体的用途,它被用于制备治疗肿瘤、病毒感染或自身免疫疾病的药物。
- [0113] 在本发明的第八方面,提供了一种药物组合物,它含有药学上可接受的载体以及安全有效量的本发明第一方面中任一所述的T细胞受体。
- [0114] 在本发明的第九方面,提供了一种治疗疾病的方法,包括给需要治疗的对象施用本发明第一方面中任一所述的T细胞受体、或第六方面中所述的T细胞受体复合物、或第八方面中所述的药物组合物。
- [0115] 在另一优选例中,所述的疾病包括:肿瘤、自身免疫疾病和病毒感染性疾病。
- [0116] 在本发明的第十方面,提供了一种制备本发明第一方面所述的T细胞受体的方法,包括步骤:
- [0117] (i) 对T细胞受体的疏水芯区域引入氨基酸残基突变;和
- [0118] (ii) 筛选稳定性显著提高的T细胞受体,从而获得本发明第一方面中所述的T细胞受体。
- [0119] 在另一优选例中,所述筛选方法包括但不限于噬菌体展示技术。
- [0120] 在另一优选例中,在步骤(ii)中,利用噬菌体展示技术展示疏水芯区域发生突变的T细胞受体,并进行筛选。
- [0121] 在另一优选例中,所述方法还包括步骤:测定所筛选出T细胞受体的序列、活性和/或其他特性。
- [0122] 应理解,在本发明范围内中,本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合,从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅,在此不再一一累述。

附图说明

- [0123] 图1显示了一种典型TCR的可变域结构示意图,该TCR为具有癌症抗原MAGE A3 HLA A1特异性的野生型TCR。
- [0124] 图2a和2b分别显示定点突变后的TCR α 链可变域氨基酸序列和核苷酸序列(SEQ ID NO:9和10)。所述氨基酸序列为对专利文献(WO2012/013913)中公开的TCR的 α 链可变域氨基酸序列进一步优化,更具体地,即将可变域中暴露于表面的疏水性残基进一步突变为亲水或极性残基,其中加粗的并带下划线的字母为突变后的氨基酸残基。
- [0125] 图3a和3b分别显示定点突变后的TCR β 链可变域氨基酸序列和核苷酸序列(SEQ ID NO:11和12)。所述氨基酸序列为对专利文献(WO2012/013913)中公开的TCR β 链可变域氨基酸序列进一步优化,更具体地,即将可变域中暴露于表面的疏水性残基进一步突变为亲水

或极性残基,其中加粗的并带下划线的字母为突变后的氨基酸残基。

[0126] 图4为构建MAGE-sTv-WT时各引物的连接方式。

[0127] 图5a和5b分别为构建sTv突变株文库时 α 与 β 链连接物的氨基酸序列和核苷酸序列 (SEQ ID NO:13和14)。

[0128] 图6a和6b分别为sTv突变株MG29的 α 链可变域氨基酸序列与 β 链可变域氨基酸序列 (SEQ ID NO:15和16),相对于MAGE-sTv-WT,突变的残基以黑体字和下划线显示。

[0129] 图7a和7b分别为sTv突变株P8F1的 α 链可变域氨基酸序列与 β 链可变域氨基酸序列 (SEQ ID NO:17和18),相对于MAGE-sTv-WT,突变的残基以黑体字和下划线显示。

[0130] 图8a和8b分别为sTv突变株P8F2的 α 链可变域氨基酸序列与 β 链可变域氨基酸序列 (SEQ ID NO:15和18),相对于MAGE-sTv-WT,突变的残基以黑体字和下划线显示。

[0131] 图9为筛选出的不同突变株及MAGE-sTv-WT对抗原MAGEA3、EBV、Flu、NY-ESO的ELISA实验OD值。

[0132] 图10a与图10b分别为LC13-WT的 α 链可变域 (SEQ ID NO:29) 与 β 链可变域 (SEQ ID NO:30)的氨基酸序列。

[0133] 图11a与图11b分别为JM22-WT的 α 链可变域 (SEQ ID NO:31) 与 β 链可变域 (SEQ ID NO:32)的氨基酸序列。

[0134] 图12a与图12b分别为1G4-WT的 α 链可变域 (SEQ ID NO:33) 与 β 链可变域 (SEQ ID NO:34)氨基酸序列。

[0135] 图13a与图13b分别为LC13-sTv α 链可变域 (SEQ ID NO:35) 与LC13-sTv β 链可变域 (SEQ ID NO:36)氨基酸序列。

[0136] 图14a与图14b分别为JM22-sTv α 链可变域 (SEQ ID NO:37) 与JM22-sTv β 链可变域 (SEQ ID NO:38)氨基酸序列。

[0137] 图15a与图15b分别为1G4-sTv α 链可变域 (SEQ ID NO:39) 与1G4-sTv β 链可变域 (SEQ ID NO:40)氨基酸序列。

[0138] 图16为构建sTv单链分子所用的连接短肽(linker)的氨基酸序列 (SEQ ID NO:41)。

[0139] 图17为纯化后的蛋白LC13-WT与LC13-sTv的SDS-PAGE胶图。泳道1:分子量标记,泳道2:LC13-WT,泳道3:LC13-sTv。

[0140] 图18a与图18b分别为纯化后的蛋白LC13-WT与LC13-sTv的SEC图谱。

[0141] 图19为纯化后的蛋白JM22-WT与JM22-sTv的SDS-PAGE胶图。泳道1:分子量标记,泳道2:JM22-WT,泳道3:JM22-sTv。

[0142] 图20a与图20b分别为纯化后的蛋白JM22-WT与JM22-sTv的SEC图谱。

[0143] 图21为纯化后的蛋白1G4-WT与1G4-sTv的SDS-PAGE胶图。泳道1:分子量标记,泳道2:1G4-WT,泳道3.1G4-sTv。

[0144] 图22a与图22b分别为纯化后的蛋白1G4-WT与1G4-sTv的SEC图谱。

[0145] 图23为1G4-sTv的氨基酸序列 (SEQ ID NO:42)。

[0146] 图24为1G4-sTv突变株针对不同抗原的OD值。

[0147] 图25为筛选到的1G4-sTv高稳定性突变株的 α 链可变域氨基酸序列 (SEQ ID NO:75-85)。

- [0148] 图26为筛选到的1G4-sTv高稳定性突变株的β链可变域氨基酸序列 (SEQ ID NO: 86-96)。
- [0149] 图27为1G4-sTv高稳定性突变株的DSC曲线图。
- [0150] 图28为1G4-WT的DSC曲线图。
- [0151] 图29a与图29b分别为高稳定性G15α链可变域 (SEQ ID NO:97) 与β链可变域 (SEQ ID NO:98) 氨基酸序列。
- [0152] 图30为纯化后蛋白1G4-WT、1G4-sTv、G13、G15、G9的SDS-PAGE胶图。泳道1:分子量标记,泳道2:1G4-WT,泳道3:1G4-sTv,泳道4:G13泳道5:G15,泳道6:分子量标记,泳道7:G9。
- [0153] 图31a、31b和31c分别为纯化后的蛋白G9、G13和G15的SEC图谱。
- [0154] 图32a与图32b分别为LC13-G9α链可变域 (SEQ ID NO:99) 与β链可变域 (SEQ ID NO:100) 氨基酸序列。
- [0155] 图33a与图33b分别为LC13-G15α链可变域 (SEQ ID NO:101) 与β链可变域 (SEQ ID NO:102) 氨基酸序列。
- [0156] 图34a与图34b分别为JM22-G9α链可变域 (SEQ ID NO:103) 与β链可变域 (SEQ ID NO:104) 氨基酸序列。
- [0157] 图35a与图35b分别为JM22-G15α链可变域 (SEQ ID NO:105) 与β链可变域 (SEQ ID NO:106) 氨基酸序列。
- [0158] 图36为纯化后蛋白LC13-WT、LC13-sTv、LC13-G15、LC13-G9的SDS-PAGE胶图。泳道1:分子量标记,泳道2:LC13-WT,泳道3:LC13-sTv泳道4:LC13-G15,泳道5:分子量标记,泳道6:LC13-G9。
- [0159] 图37为纯化后蛋白LC13-G9的SEC图谱。
- [0160] 图38为纯化后蛋白LC13-G15的SEC图谱。
- [0161] 图39为纯化后蛋白JM22-WT、JM22-sTv、JM22-G15、JM22-G9的SDS-PAGE胶图。泳道1:分子量标记,泳道2:JM22-WT,泳道3:JM22-sTv 泳道4:JM22-G15,泳道5:JM22-G9。
- [0162] 图40为纯化后蛋白JM22-G9的SEC图谱。
- [0163] 图41为纯化后蛋白JM22-G15的SEC图谱。
- [0164] 图42a与图42b分别为MAGE-G15α链可变域 (SEQ ID NO:107) 与β链可变域 (SEQ ID NO:108) 氨基酸序列。
- [0165] 图43为纯化后蛋白MAGE-G15的SDS-PAGE胶图。泳道1:分子量标记,泳道2:MAGE-G15。
- [0166] 图44为纯化后蛋白MAGE-G15的SEC图谱。
- [0167] 图45为纯化后蛋白MAGE-G15的DSC曲线图。
- [0168] 图46为纯化后蛋白G15的DSC曲线图。
- [0169] 图47为纯化后蛋白LC13-sTv的DSC曲线图。
- [0170] 图48a和48b分别为纯化后蛋白JM22-WT和JM22-sTv的DSC曲线图。
- [0171] 图49a和49b分别为纯化后蛋白LC13-G9与LC13-G15的DSC曲线图。

具体实施方式

- [0172] 本发明人经过广泛而深入的研究,首次发现,通过有针对性地对T细胞受体的疏水

芯区域进行突变,可意外地获得高稳定性的突变型TCR,尤其是可溶性TCR。在此基础上完成了本发明。

[0173] 本发明人使用了优化的TCR蛋白结构,通过改变TCR的疏水芯,构建出一种高稳定性的TCR分子。本发明构建了新型的单链TCR可变域,通过定向的分子进化法,分离出了最佳的疏水芯。具有新型疏水芯的TCR片段,可通过用亲水或极性残基取代TCR可变域中暴露于表面的疏水残基,来进一步改进。

[0174] 术语

[0175] TCR

[0176] 天然 α - β 异源二聚TCR具有 α 链和 β 链。广义上讲,各链包含可变区、连接区和恒定区, β 链通常还在可变区和连接区之间含有短的多变区,但该多变区常视作连接区的一部分。各可变区的3个CDR(互补决定区)嵌合在可变区的框架(framework)中,疏水芯也位于可变区的框架中。 α 链可变区($V\alpha$)可分成几类, β 链可变区($V\beta$)也可分成几类。在国际免疫遗传学信息系统(IMG T)中,以唯一的TRAV编号和TRBV编号分别指代 $V\alpha$ 类型和 $V\beta$ 类型,TRAJ和TRBJ指代TCR的连接区。本发明中所用的 α 链J基因即指TRAJ, β 链J基因指TRBJ。TCR的 α 和 β 链常视作各自具有两个“结构域”,即“可变域”和“恒定域”。可变域由连接在一起的可变区和连接区构成。因此,在本申请的说明书和权利要求书中,术语“TCR α 可变域”指连接在一起的TRAV和TRAJ,术语“TCR β 可变域”指连接在一起的TRBV和TRBJ。

[0177] TCR领域的工作人员广为知晓并可得到IMG T中给出的TCR的氨基酸序列及其可变域框架(framework)包括疏水芯位置在IMG T中的具体位置编号。例如,可以在IMG T公开数据库中找到。本发明中,所述TCR氨基酸位置编号均按照IMG T中列出的位置编号,除非另有说明。如果今后IMG T中列出的位置编号有变动,则以2013年1月1日版本的IMG T中列出的TCR的氨基酸序列位置号为准。

[0178] 如本文所用,术语“疏水芯”又可称为“疏水核心”指在任何蛋白质溶于水时,蛋白结构域中一般包含在其分子结构内部,大部分由疏水性氨基酸构成的核心区域。在TCR中,TCR α 链可变域的疏水芯为可变区氨基酸第11,13,19,21,53,76,89,91,94位和 α 链J基因(TRAJ)短肽氨基酸位置倒数第3,5,7位;TCR β 链可变域的疏水芯为可变区氨基酸第11,13,19,21,53,76,89,91,94位和 β 链J基因(TRAJ)短肽氨基酸位置倒数第2,4,6位。上述位置编号采用IMG T中列出的位置编号。

[0179] 如附图1所示为具有癌症抗原MAGE A3HLA A1特异性的野生型TCR的可变区结构示意图,示意图的左下方与右下方的两个椭圆中加粗的氨基酸残基即分别为 α 与 β 链可变区骨架(framework)位置的疏水芯。TCR的抗原结合位点在CDR区,CDR区决定了TCR与其相应抗原间的结合亲和力。从图中可以看出,疏水芯并不在CDR区,它的突变并不应该影响TCR与其相应抗原的结合以及结合亲和力,但根据本发明人的研究疏水芯的改变会对TCR分子的稳定性产生影响。

[0180] 应理解,该TCR的结构示意图仅用于说明本发明,而不能以任何方式限制本发明的范围。

[0181] 术语“sTv”指功能结构域由一柔性肽链连接的TCR的 α 与 β 链的可变域而构成的单链TCR,其柔性肽链可以是任何适合连接TCR α 与 β 可变域的肽链,肽链的氨基酸残基数量可以是1到50个,但不限于1到50个。

[0182] 术语“稳定性”指蛋白质稳定性的任何方面。与初始野生型的蛋白质相比,经过筛选得到的高稳定性蛋白质具有一个或一个以上的下列特征:更抗解折叠、更抗不适当或不希望的折叠、复性能力更强、表达能力更强、蛋白复性收率更高、热稳定性增加、在多种环境(例如,PH值、盐浓度、存在洗涤剂、存在变性剂等)下稳定性增加。

[0183] 噬菌体展示系统和筛选高稳定性的TCR

[0184] 当使用噬菌体展示系统来分离受体的时候,通常是通过两种重要的性质筛选得到最终的受体,第一是受体与配体的结合强度或亲和力,第二是受体在噬菌体表面的展示密度。第一个性质是蛋白质亲和力进化的基础,它指导产生高亲和性受体的所有方法论的发展。一个简单的描述如下:当受体展示文库上样于配体时,具有更高结合强度的受体会以更快的速度和/或更长的保留时间结合于配体,并能够抵抗更高强度的洗涤。因此,这些受体及其编码基因就会被捕获并在后续过程中放大。另一方面,当受体-配体相互作用的亲和力没被改变或改变程度不大,甚至变低,亲和力因素就对于筛选不起作用,展示密度就会主导进化结果。这就意味着当更多正确折叠的受体分子展示在一个噬菌体粒子上面或者更多的噬菌体粒子展示一个或多个这样的受体时,该受体和编码基因就有更多的机会与配体结合,在规定洗涤条件下应滞留更多的该受体,从而被捕获并在后续的筛选过程中扩大。基于第二个性,通过使用噬菌体展示技术或其他定向的分子展示技术可以分离出更稳定的蛋白质。本发明人已经设计出了TCR蛋白质疏水芯的定向进化文库,来分离更稳定的蛋白质或TCR。已证实,这样的疏水芯对TCR与其配体pMHC或pHLA的结合强度基本没有影响,因为TCR是通过它的互补决定区(CDR)与pMHC结合。

[0185] 在本发明中,可使用噬菌体展示技术来分离更稳定的蛋白构建物。在一个优选例中,用具有癌症抗原MAGE A3 HLA A1特异性的TCR(以下简称MAGE A3 TCR)胞外结构域来测试这个设想。根据专利文献里面的序列来合成胞外结构域,当它表达在丝状噬菌体的表面时,TCR与pMHC的结合就可以通过ELISA(酶联免疫吸附测定法)进行检测并得到其相互作用强度。然而,按已发表的改进方法如将可变域中暴露于表面的疏水残基突变为亲水或极性的残基后,用ELISA检测通过噬菌体展示的该TCR的 α 与 β 链的可变域组成的单链TCR形式(sTv)时没有发现任何结合功能。可是将该单链TCR(sTv)可变域疏水芯的限制性随机突变的文库克隆入噬菌体展示载体并通过几轮的筛选后,却意外地得到了一些高稳定性的克隆,再使用ELISA检测这些克隆就可以查到与相应pMHC的结合。

[0186] 活性多肽

[0187] 在本发明中,术语“本发明多肽”、“本发明的TCR”、“本发明的T细胞受体”可互换使用,都指这样的T细胞受体(TCR),所述TCR的疏水芯区域发生突变,并且该TCR的稳定性显著高于其对应的疏水芯为野生型的TCR。

[0188] 此外,本发明的多肽还可包括在疏水芯区域之外的其他突变,尤其是那些可以提高亲和力的突变以及TCR可变域中暴露于表面的氨基酸残基的突变。

[0189] 这些疏水芯区域之外的其他变异形式包括(但不限于):1-6个(通常为1-5个,较佳地1-3个,更佳地1-2个,最佳地1个)氨基酸的缺失、插入和/或取代,在C末端和/或N末端添加一个或数个(通常为5个以内,较佳地为3个以内,更佳地为2个以内)氨基酸。例如,在本领域中,用性能相近或相似的氨基酸进行取代时,通常不会改变蛋白质的功能。在C末端和/或N末端添加一个或数个氨基酸通常也不会改变蛋白质的结构和功能。此外,所述术语还包括

单体和多聚体形式的本发明多肽。

[0190] 应理解,本文中氨基酸名称用国际通用的单英文字母标识,与其相对应的氨基酸名称三英文字母简写分别是:Ala (A)、Arg (R)、Asn (N)、Asp (D)、Cys (C)、Gln (Q)、Glu (E)、Gly (G)、His (H)、Ile (I)、Leu (L)、Lys (K)、Met (M)、Phe (F)、Pro (P)、Ser (S)、Thr (T)、Trp (W)、Tyr (Y)、Val (V)。本文中氨基酸取代的书写方式如L19V代表按照IMGT中给出的位置编号第19位的L(亮氨酸)被V(缬氨酸)取代,其他相同的氨基酸取代书写方式的含义参照本例。

[0191] 本发明还包括本发明多肽的活性片段、衍生物和类似物。如本文所用,术语“片段”、“衍生物”和“类似物”是指能与配体分子结合的多肽。本发明的多肽片段、衍生物或类似物可以是(i)有一个或多个保守或非保守性氨基酸残基(优选保守性氨基酸残基)被取代的多肽,或(ii)在一个或多个氨基酸残基中具有取代基团的多肽,或(iii)本发明TCR与另一个化合物(比如延长多肽半衰期的化合物,例如聚乙二醇)融合所形成的多肽,或(iv)附加的氨基酸序列融合于此多肽序列而形成的多肽(与前导序列、分泌序列或6His等标签序列融合而形成的融合蛋白)。根据本文的教导,这些片段、衍生物和类似物属于本领域熟练技术人员公知的范围。

[0192] 一类优选的活性衍生物指具有至多5个,较佳地至多3个,更佳地至多2个,最佳地1个氨基酸被性质相似或相近的氨基酸所替换而形成多肽。这些保守性变异多肽最好根据表A进行氨基酸替换而产生。

[0193] 表A

[0194]

最初的残基	代表性的取代	优选的取代
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp

	Gly (G)	Pro; Ala	Ala
	His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
	Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe	Leu
	Leu (L)	Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
	Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
	Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
[0195]	Phe (F)	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Leu
	Pro (P)	Ala	Ala
	Ser (S)	Thr	Thr
	Thr (T)	Ser	Ser
	Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
	Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
	Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala	Leu

[0196] 发明还提供本发明TCR的类似物。这些类似物与本发明原TCR多肽的差别可以是氨基酸序列上的差异,也可以是不影响序列的修饰形式上的差异,或者兼而有之。类似物还包括具有不同于天然L-氨基酸的残基(如D-氨基酸)的类似物,以及具有非天然存在的或合成的氨基酸(如 β 、 γ -氨基酸)的类似物。应理解,本发明的多肽并不限于上述例举的代表性的多肽。

[0197] 修饰(通常不改变一级结构)形式包括:体内或体外的多肽的化学衍生形式如乙酰化或羧基化。修饰还包括糖基化,如那些在多肽的合成和加工中或进一步加工步骤中进行糖基化修饰而产生的多肽。这种修饰可以通过将多肽暴露于进行糖基化的酶(如哺乳动物的糖基化酶或去糖基化酶)而完成。修饰形式还包括具有磷酸化氨基酸残基(如磷酸酪氨酸,磷酸丝氨酸,磷酸苏氨酸)的序列。还包括被修饰从而提高了其抗蛋白水解性能或优化了溶解性能的多肽。

[0198] 本发明多肽还可以以由药学上或生理学可接受的酸或碱衍生的盐形式使用。这些盐包括(但不限于)与如下酸形成的盐:氢氯酸、氢溴酸、硫酸、柠檬酸、酒石酸、磷酸、乳酸、丙酮酸、乙酸、琥珀酸、草酸、富马酸、马来酸、草酰乙酸、甲磺酸、乙磺酸、苯磺酸、或羟乙磺酸。其他盐包括:与碱金属或碱土金属(如钠、钾、钙或镁)形成的盐,以及以酯、氨基甲酸酯或其他常规的“前体药物”的形式。

[0199] 本发明的多肽可以多价复合体的形式提供。本发明的多价TCR复合体包含两个、三个、四个或更多个与另一分子相连的T细胞受体分子。

[0200] 编码序列

[0201] 本发明还涉及编码本发明TCR的多核苷酸。

[0202] 本发明的多核苷酸可以是DNA形式或RNA形式。DNA可以是编码链或非编码链。例

如,编码成熟多肽的编码区序列可以与SEQ ID NO:10所示的编码区序列相同或者是简并的变异体。如本文所用,“简并的变异体”在本发明中是指编码具有SEQ ID NO:9蛋白质,但与SEQ ID NO:10中相应编码区序列有差别的核酸序列。

[0203] 本发明的核苷酸全长序列或其片段通常可以用但不限于PCR扩增法、重组法或人工合成的方法获得。目前,已经可以完全通过化学合成来得到编码本发明多肽(或其片段,或其衍生物)的DNA序列。然后可将该DNA序列引入本领域中已知的各种现有的DNA分子(如载体)和细胞中。

[0204] 本发明也涉及包含本发明的多核苷酸的载体,以及用本发明的载体或编码序列经基因工程产生的宿主细胞。

[0205] 另一方面,本发明还包括对本发明TCR多肽具有特异性的多克隆抗体和单克隆抗体,尤其是单克隆抗体。

[0206] 制备方法

[0207] 产生本发明的TCR的一种方法是从展示此类TCR的噬菌体颗粒的多样性文库中选择出高稳定性的TCR。

[0208] 可采用任何合适的方法进行突变,包括但不限于依据聚合酶链式反应(PCR)的那些、依据限制性酶的克隆或不依赖连接的克隆(LIC)方法。许多标准分子生物学教材详述了这些方法。聚合酶链式反应(PCR)诱变和依据限制性酶的克隆的更多细节可参见Sambrook和Russell,(2001)分子克隆-实验室手册(Molecular Cloning-A Laboratory Manual)(第三版)CSHL出版社。LIC方法的更多信息可见(Rashtchian,(1995)Curr Opin Biotechnol 6(1):30-6)。

[0209] 本发明多肽可以是重组多肽或合成多肽。本发明的多肽可以是化学合成的,或重组的。相应地,本发明多肽可用常规方法人工合成,也可用重组方法生产。

[0210] 通过常规的重组DNA技术,可利用本发明的多核苷酸来表达或生产重组的本发明多肽。一般来说有以下步骤:

[0211] (1)用编码本发明TCR多肽的多核苷酸(或变异体),或用含有该多核苷酸的重组表达载体转化或转导合适的宿主细胞;

[0212] (2)在合适的培养基中培养宿主细胞;

[0213] (3)从培养基或细胞中分离、纯化出本发明TCR多肽。

[0214] 重组多肽可在细胞内、或在细胞膜上表达、或分泌到细胞外。如果需要,可利用其物理的、化学的和其它特性通过各种分离方法分离和纯化重组的蛋白。这些方法是本领域技术人员所熟知的。这些方法的例子包括但并不限于:常规的复性处理、用蛋白沉淀剂处理(盐析方法)、离心、渗透破菌、超处理、超离心、分子筛层析(凝胶过滤)、吸附层析、离子交换层析、高效液相层析(HPLC)和其它各种液相层析技术及这些方法的结合。

[0215] 药物组合物和施用方法

[0216] 本发明的TCR和本发明TCR转染的T细胞可与药学上可接受的载体一起在药物组合物中提供。本发明的TCR、多价TCR复合物和细胞通常作为无菌药物组合物的一部分提供,所述组合物通常包括药学上可接受的载体。该药物组合物可以是任何合适的形式(取决于给予患者的所需方法)。其可采用单位剂型提供,通常在密封的容器中提供,可作为试剂盒的一部分提供。此类试剂盒(但非必需)包括使用说明书。其可包括多个所述单位剂型。

[0217] 此外,本发明的多肽可以单用,也可与其他治疗剂结合或偶联在一起使用(如配制在同一药物组合物中)。

[0218] 可与本发明TCR结合或偶联的治疗剂包括但不限于:1.放射性核素(Koppe等,2005,癌转移评论(Cancer metastasis reviews)24,539);2.生物毒素(Chaudhary等,1989,自然(Nature)339,394;Epel等,2002,癌症免疫学和免疫治疗(Cancer Immunology and Immunotherapy)51,565);3.细胞因子(Gillies等,1992,美国国家科学院院刊(PNAS)89,1428;Card等,2004,癌症免疫学和免疫治疗(Cancer Immunology and Immunotherapy)53,345;Halin等,2003,癌症研究(Cancer Research)63,3202);4.抗体Fc片段(Mosquera等,2005,免疫学杂志(The Journal Of Immunology)174,4381);5.抗体scFv片段(Zhu等,1995,癌症国际期刊(International Journal of Cancer)62,319);6.金纳米颗粒/纳米棒(Lapotko等,2005,癌症通信(Cancer letters)239,36;Huang等,2006,美国化学学会杂志(Journal of the American Chemical Society)128,2115);7.病毒颗粒(Peng等,2004,基因治疗(Gene therapy)11,1234);8.脂质体(Mamot等,2005,癌症研究(Cancer research)65,11631);9.纳米磁粒;10.前药激活酶(例如,DT-心肌黄酶(DTD)或联苯基水解酶-样蛋白质(BPHL));11.化疗剂(例如,顺铂)等。

[0219] 药物组合物还可含有药学上可接受的载体。术语“药学上可接受的载体”指用于治疗剂给药的载体。该术语指这样一些药剂载体:它们本身不诱导产生对接受该组合物的个体有害的抗体,且给药后没有过分的毒性。这些载体是本领域普通技术人员所熟知的。在雷明顿药物科学(Remington's Pharmaceutical Sciences(Mack Pub.Co.,N.J.1991))中可找到关于药学上可接受的赋形剂的充分讨论。这类载体包括但并不限于:盐水、缓冲液、葡萄糖、水、甘油、乙醇、佐剂、及其组合。

[0220] 治疗性组合物中药学上可接受的载体可含有液体,如水、盐水、甘油和乙醇。另外,这些载体中还可能存在辅助性的物质,如润湿剂或乳化剂、pH缓冲物质等。

[0221] 通常,可将治疗性组合物制成可注射剂,例如液体溶液或悬液;还可制成在注射前适合配入溶液或悬液中、液体载体的固体形式。

[0222] 一旦配成本发明的组合物,可将其通过常规途径进行给药,其中包括(但并不限于):眼内、肌内、静脉内、皮下、皮内、或局部给药。待预防或治疗的对象可以是动物;尤其是人。

[0223] 当本发明的药物组合物被用于实际治疗时,可根据使用情况而采用各种不同剂型的药物组合物。较佳地,可以例举的有针剂、口服剂等。

[0224] 这些药物组合物可根据常规方法通过混合、稀释或溶解而进行配制,并且偶尔添加合适的药物添加剂,如赋形剂、崩解剂、粘合剂、润滑剂、稀释剂、缓冲剂、等渗剂(isotonicities)、防腐剂、润湿剂、乳化剂、分散剂、稳定剂和助溶剂,而且该配制过程可根据剂型用惯常方式进行。

[0225] 本发明的药物组合物还可以缓释剂形式给药。例如,本发明多肽可被掺入以缓释聚合物为载体的药丸或微囊中,然后将该药丸或微囊通过手术植入待治疗的组织。作为缓释聚合物的例子,可例举的有乙烯-乙烯基乙酸酯共聚物、聚羟基甲基丙烯酸酯(polyhydrometaacrylate)、聚丙烯酰胺、聚乙烯吡咯烷酮、甲基纤维素、乳酸聚合物、乳酸-乙醇酸共聚物等,较佳地可例举的是可生物降解的聚合物如乳酸聚合物和乳酸-乙醇酸共

聚物。

[0226] 当本发明的药物组合物被用于实际治疗时,作为活性成分的本发明多肽或其药学上可接受的盐的剂量,可根据待治疗的每个病人的体重、年龄、性别、症状程度而合理地加以确定。

[0227] 本发明TCR的用途

[0228] 本发明的TCR可用作药物或诊断试剂。可通过修饰或其他改进以使其获得更适于作为药物或诊断试剂使用的特征。该药物或诊断试剂可用于治疗或诊断多种不同的疾病,所述疾病包括但不限于:癌症(例如肾癌、卵巢癌、头和颈癌、睾丸癌、肺癌、胃癌、子宫颈癌、膀胱癌、前列腺癌或黑素瘤等)、自身免疫病、病毒感染性疾病、移植排斥和移植物抗宿主病。

[0229] 通过本发明TCR的特异性可实现药物定位或靶向给药,从而提高多种疾病的治疗或诊断效果。

[0230] 对于癌症,定位于肿瘤或转移癌的附近可提高毒素或免疫刺激物的效果。在自身免疫病中,可特异性地抑制对正常细胞或组织的免疫反应,或缓慢释放免疫抑制药,使其在更长的时间范围内产生更多的局部效果,从而对受试者的整体免疫能力的影响减至最小。在防止移植排斥中,可以同样的方式优化免疫抑制的作用。对于已存在药物的病毒性疾病,例如HIV、SIV、EBV、CMV、HCV、HBV,药物在感染细胞区域附近释放或发挥激活功能也是有益的。

[0231] 本发明的TCR可用于调节T细胞激活,本发明的TCR通过结合特异的pMHC并由此抑制T细胞活化。涉及T细胞介导的炎症和/或组织损伤的自身免疫病可适于此方法,例如I型糖尿病。

[0232] 本发明的TCR也可用于将细胞毒性剂递送至癌细胞的目的,或可用于转染T细胞,从而使它们能够破坏呈递HLA复合物的肿瘤细胞,以便在称为过继免疫治疗的治疗过程中给予患者。

[0233] 本发明的TCR也可用作诊断试剂。用可检测标记物对本发明的TCR进行标记,如用适用于诊断目的的标记物标记,来检测MHC-肽与MHC-肽特异性的本发明TCR之间的结合。荧光标记的TCR多聚体适用于FACS分析,可用来检测携带TCR特异性的肽的抗原呈递细胞。

[0234] 与偶联物结合的本发明TCR,所述偶联物包括但不限于抗-CD3抗体,可以重新定向T细胞,从而使其靶向呈递特定抗原的细胞,如肿瘤细胞。

[0235] 工业应用性

[0236] 本发明的高稳定性T细胞受体,可用于研究TCR与pMHC(肽-主组织相容性复合体)之间的相互作用及疾病的诊断和治疗等目的。

[0237] 本发明的主要优点包括:

[0238] (a) 本发明TCR多肽的稳定性高;

[0239] (b) 可以高效、简便地筛选获得高稳定性的TCR多肽。

[0240] (c) 可进一步筛选获得高稳定性和高亲和性的TCR多肽。

[0241] 下面的具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,例如Sambrook和Russell等人,分子克隆:实验室手册(Molecular Cloning-A Laboratory

Manual) (第三版) (2001) CSHL出版社中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明,否则百分比和份数是重量百分比和重量份数。

[0242] 实施例1 初级单链TCR可变域 (sTv) 的构建和序列的优化

[0243] 设计如表1所示引物分别将化学合成的TCR α 链和 β 链可变域氨基酸序列(引用于专利文献W02012/013913)进行定向点突变。这些突变使该TCR α 链和 β 链可变域中暴露于表面的疏水残基变为亲水或极性残基,以用来制作疏水芯突变文库的模板。对于 α 链第20位的表面疏水残基V突变为亲水残基S的过程是在构建疏水芯突变文库时,利用定点突变技术完成的。

[0244] 表1 用来定点突变氨基酸序列的引物及连接物

引物名称	引物序列 (5' -3')	SEQ ID NO:
YW800	aacaggagtgacgcagtcctccttcctgtgagtg	1
YW801	ttagcgccatggcccaaaaacaggaggtgacgcagtc	2
[0245] YW802	gaatcttctcagcccggggac	3
YW803	cgggctgagaagattcaatg	4
YW804	gccaccgccagatccaccgggcccctggagtgaccgag	5
YW805	gtggatctggcgggtggcggtaaggcgggtgggaa gcggcggcggaggcgaaggaggctccggag	6
[0246] YW806	gcgaaggaggctccggaggcaaggctggagtcactcaaac	7
YW807	ctagatgcggccgcctctgtgaccgtgagcctg	8

[0247] 其中YW800、YW801、YW802、YW803、YW804为定点突变 α 链可变域所设计的引物, YW806、YW807为定向突变 β 链可变域所设计的引物, YW805为连接引物用于引入柔性肽链。按照附图4所示引物连接方式进行PCR构建sTv,将此sTv命名为MAGE-sTv-WT。

[0248] 具体的PCR诱变实验步骤如下:

[0249] 第一步PCR,分别用合成的 α 或 β 链为模板,使用下列引物对YW801/YW803(α 链), YW802/YW804(α 链), YW806/YW807(β 链)进行PCR。反应程序是:98°C变性30秒一次,25次的重复循环94°C5秒,55°C10秒,72°C20秒。

[0250] 第二步PCR,以重叠PCR(overlap PCR)方法,用第一步PCR纯化后的产物和化学合成的柔性肽单链DNA为模板, YW800/YW807为引物进行第二步PCR。其反应程序是:98°C变性30秒一次,30次的重复循环94°C5秒,55°C10秒,72°C30秒,1次72°C5分钟。纯化后的第二步PCR产物经酶切后连接入噬菌体展示载体。

[0251] 实施例2 将MAGE-sTv-WT序列克隆入基于pET-28a的表达质粒

[0252] 通过《分子克隆实验室手册》(Molecular Cloning a Laboratory Manual) (第三版, Sambrook和Russell)中描述的标准方法将MAGE-sTv-WT克隆入pET-28a(Novagen)表达质粒。利用ABI公司的3730DNA分析仪测序质粒。

[0253] 将NcoI和NotII切割的编码MAGE-sTv-WT的DNA序列连接入用NcoI和NotII切割的pET-28a载体(Novagen)。

[0254] 将连接的质粒转化入常规的感受态大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 菌株BL21 (DE3) (购自merck公司) 细胞, 接种在含有50 μ g/mL卡那霉素的LB/琼脂板上。37 $^{\circ}$ C温育过夜后, 挑取单个菌落, 37 $^{\circ}$ C, 在含有50 μ g/mL卡那霉素的5mlLB中震荡生长过夜。利用Zymo公司的质粒提取试剂盒 (Zyppy Plasmid Midiprep Kit, Zymo) 纯化克隆的质粒, 由ABI公司的3730DNA测序仪测序插入物。

[0255] 图2a和3a分别显示MAGE-sTv-WT的 α 链可变域与 β 链可变域氨基酸序列 (SEQ ID NO:9和11), 优化后的氨基酸位点以加粗和下划线显示。图2b和3b分别显示MAGE-sTv-WT的 α 链可变域与 β 链可变域核苷酸序列 (SEQ ID NO:10和12)。

[0256] 实施例3 MAGE-sTv-WT的表达、复性和纯化

[0257] 将实施例2中得到的含有MAGE-sTv-WT的表达质粒转化到大肠杆菌菌株Rosetta (DE3) (Merck) 的培养基平板上, 在37 $^{\circ}$ C培养过夜, 挑单菌落在37 $^{\circ}$ C含有卡那霉素培养基中培养至OD₆₀₀为0.6-0.8, 然后用0.5mM IPTG诱导蛋白质表达4小时, 用FisherThermo Sovall R6+离心机以5,000rpm离心15分钟收获细胞。用Bugbuster MasterMix (Merck) 裂解细胞沉淀物。用FisherThermo Sovall X1R离心机以6,000g离心15分钟以回收包涵体沉淀物。之后用10倍稀释的Bugbuster溶液三次洗涤包涵体以除去细胞碎片和膜组分。然后利用以下缓冲液溶解包涵体: 20mM Tris, pH 9.0, 8M尿素。用BCA法定量后分装为10mg每管在-80 $^{\circ}$ C冷冻。

[0258] 解冻10mg溶解的MAGE-sTv-WT包涵体蛋白, 滴到以下的200ml复性缓冲液中: 100mM Tris, pH 9.0, 400mM L-精氨酸, 2mM EDTA。加入氧化型和还原型谷胱甘肽氧化还原对至终浓度分别为1mM和10mM, 溶液在10 $^{\circ}$ C搅拌10分钟后以100rpm摇1-2天。4-8 $^{\circ}$ C下, 用分子截留量为4kd的纤维素膜透析袋和5L 20mM Tris pH 9.0透析复性MAGE-sTv-WT 8小时, 再更换相同的新鲜缓冲液透析两次。

[0259] 将透析后的复性MAGE-sTv-WT离心后上阴离子交换柱Q HP 5ml (GE公司), 利用AKTA纯化仪 (GE公司), 用20mM Tris pH 9.0配制的0-1M NaCl线性梯度洗脱结合的蛋白质10个柱体积, 收集洗脱峰 (相对分子质量约为28kd) 并跑SDS-PAGE (Bio-Rad) 进行分析。包含MAGE-sTv-WT的组分浓缩后进一步用凝胶过滤柱 (Superdex 75 10/300, GE Healthcare) 进行纯化。纯化后如果能够得到目标组分则将目标组分跑SDS-PAGE胶并分析并, 之后将目标组分保存于4 $^{\circ}$ C。合并目标峰组分并浓缩, 置换到10mM pH7.4的HEPES缓冲液。

[0260] 洗脱组分进一步采用凝胶过滤法测试其纯度。条件为: 色谱柱Agilent Bio SEC-3 (300A, ϕ 7.8 \times 300 mm), 流动相为150mM磷酸盐缓冲液, 流速0.5mL/min, 柱温25 $^{\circ}$ C, 紫外检测波长214nm。

[0261] 实施例4 产生MAGE-sTv-WT的高稳定性变体

[0262] 利用噬菌体展示技术产生MAGE-sTv-WT疏水芯变体文库, 用以筛选并鉴定高稳定性的突变体。通过诱变MAGE-sTv-WT的疏水芯位点来构建疏水芯突变文库, 并对文库进行淘选和筛选。上述疏水芯文库构建及筛选方法可以参照Li等在 ((2005) Nature Biotech 23 (3):349-354) 中描述的噬菌体展示和高亲和性TCR噬菌体文库的构建及筛选方法, 设计上的不同点在于构建疏水芯突变文库时, 需要根据模板链的疏水芯位点来设计引物, 而高亲和性TCR文库的构建是根据模板链的CDR区来设计引物。构建疏水芯突变文库时, 设计的引物如下表2所示。

[0263] 表2 构建MAGE-sTv-WT疏水芯变体文库时所设计的引物

引物名称	引物序列 (5' -3')	SEQ ID NO:
YW817	gttttctccttctgggacac	19
YW818	GtcccagaaggagaaaacNTKtctNTKaaactgcagtttctactg	20
YW819	gtataaagtactacgtcctgatg	21
YW820	CaggacgtagtactttatacNTKgaatcttctcagc	22
YW821	ttgctgtcctctcgttttggac	23
YW822	CaaaacgagaggacagcaaNTKacaNTKagctgctcccctatc	24
YW823	attcatctcagagcgagag	25
YW824	CtcgctctgagatgaatNTKagcaccttggagctg	26
YW825	gccgctctgtgaccgtmancctmrkgcccggcccgaagtac	27
YW826	acggtcacagaggcggccgcatctagaattc	28

[0265] 本发明中所用的简并碱基,如本领域技术人员熟知的那样,可以分别代表的碱基类型如下:B=C或G或T;D=A或G或T;H=A或C或T;K=G或T;M=A或C;N=A或C或G或T;R=A或G;S=C或G;V=A或C或G;W=A或T;Y=C或T。

[0266] 为了让稳定性差的突变株在噬菌体展示过程中被淘汰,更稳定的突变株被筛选到,采用以下三种处理方法:1.在37℃展示sTv;2.加入诱导剂(如IPTG)诱导sTv在噬菌体表面展示;3.筛选前将展示sTv的噬菌体在55℃孵育60分钟。

[0267] 经测序鉴定,利用上述方法筛选到的高稳定性sTv突变株的疏水芯均发生了突变。筛选到的高稳定性的突变株命名为MG29、P8F1和P8F2。根据IMGT中的位置编号,其 α 链可变域的一个或多个下列疏水芯位置的氨基酸发生突变:第19位、第21位、第91位;和/或其 β 链可变域的一个或多个下列疏水芯位置的氨基酸发生突变:第91位、 β 链J gene短肽氨基酸序列倒数第4位。更具体地,根据IMGT中的位置编号,其具有一个或多个下列 α 链可变域氨基酸残基19V、21I、91L和/或具有一个或多个下列 β 链可变域氨基酸残基91F或91I; β 链J基因倒数第4位为M。具体的 α 链可变域氨基酸序列为SEQ ID NO:15和17; β 链可变域氨基酸序列为SEQ ID NO:16和18。其中,组成突变株MG29的 α 与 β 链可变域的氨基酸序列分别为SEQ ID NO:15和16,如图6a和6b所示;组成突变株P8F1的 α 与 β 链可变域的氨基酸序列分别为SEQ ID NO:17和18,如图7a和7b所示;组成突变株P8F2的 α 与 β 链可变域的氨基酸序列分别为SEQ ID NO:15和18,如图8a和8b所示;

[0268] 将上述筛选到的OD值较高的高稳定性突变株MG29、P8F1、P8F2及疏水芯未发生突变的MAGE-sTv-WT进行ELISA实验比较其OD值,并验证突变株的特异性。

[0269] ELISA实验步骤:

[0270] 1.分别接种MAGE-sTv-WT、MG29、P8F1、P8F2甘油菌至5mL 2xTY (100 μ g/mL氨苄青霉素,2%葡萄糖),250rpm/min,37℃培养过夜。

[0271] 2.分别接种培养过夜的菌液50 μ L至新鲜的5mL 2xTY (100 μ g/mL氨苄青霉素,2%葡萄糖),250rpm/min,37℃培养至OD₆₀₀=0.4;用5 μ L (6.5 $\times 10^{10}$)。KM13辅助噬菌体(Source BioScience)感染,37℃静止30min后,200rpm/min,37℃振荡30min,离心将沉淀重悬于30mL 2xTY (100 μ g/mL氨苄青霉素,50 μ g/mL卡那霉素,0.1%葡萄糖),250rpm/min,30℃培养过夜。

[0272] 3.用10 μ g/mL链霉亲和素(PBS,pH=7.4)包被免疫吸附板(NUNC),100 μ L每孔,4℃

过夜。

[0273] 4. 离心收集过夜培养的菌液上清,用1/4体积比的PEG/NaCl沉淀上清液中的噬菌体,冰上放置1h,离心收集沉淀,重悬于3mL PBS。

[0274] 5. 用0.1%PBST洗板3次后,每孔加400 μ L,3%Marvel-PBS (Cadbury Schweppes),37 $^{\circ}$ C封闭2h;PBST洗板3次,每孔加100 μ L 10ug/mL的pMHC,室温放置1h;洗板3次,每孔加100 μ L噬菌体样品(10 μ L PEG沉淀的样品与3%的Marvel-PBS室温孵育1h),室温放置1h;洗板3次后,每孔加100 μ L,anti-M13-HRP conjugate (GE Healthcare) (1:5000稀释于3%的Marvel-PBS中),室温放置1h;洗板6次,每孔加100 μ L TMD,放置5min后,每孔加100 μ L,1M硫酸终止。

[0275] 6. 读取450nm、650nm吸光值。

[0276] 上述突变株的ELISA实验OD值如附图9所示,此结果显示了疏水芯优化后的sTv特异性保持与疏水芯为野生型的MAGE-sTv-WT相同。在本实验中,MAGE-sTv-WT由于展示太差,其OD值极低,说明即使将 α 链和 β 链可变域中暴露于表面的疏水残基变为亲水或极性残基,其蛋白稳定性仍相对较差,因此仍需要对疏水芯进行优化。疏水芯被优化的克隆都能不同程度地展示sTv,并与其原配体MAGE A3 pHLA-A1抗原发生特异性结合,但与其它无关抗原,如EBV,流感和NY-ESO-1抗原没有结合。MG29、P8F1和P8F2等这些通过噬菌体展示检测到的疏水芯突变的sTv与特异性抗原的结合不应是由于其亲和力较野生的TCR强的原因,这一点在实施例15得到了证明

[0277] 实施例5 构建疏水芯突变的高稳定性sTv分子

[0278] 根据本领域技术人员熟知的定点突变方法将实施例4中筛选到的高稳定性变体的部分疏水芯引入到几种其他的TCR分子中,构建高稳定性sTv分子。

[0279] 根据几种分别针对抗原短肽HLA-B8/FLRGRAYGL(源自EB病毒抗原EBNA3A)、HLA-A2/GILGFVFTL(源自流感病毒基质蛋白)和HLA-A2/SLLMWITQC(NY-ESO-1肿瘤特异性抗原)的野生型TCR分子的 α 和 β 链的可变域来分别构建上述几种分子的单链形式,并分别命名为LC13-WT、JM22-WT和1G4-WT。其中,LC13-WT的 α 链和 β 链可变域氨基酸序列分别为SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:30,如图10a和10b所示;JM22-WT的 α 链和 β 链可变域氨基酸序列分别为SEQ ID NO:31和SEQ ID NO:32,如图11a和11b所示;1G4-WT的 α 链和 β 链可变域氨基酸序列分别为SEQ ID NO:33和SEQ ID NO:34,如图12a和12b所示。

[0280] 将实施例4中筛选到的高稳定性变体的部分疏水芯通过本领域技术人员熟知的定点突变的方法分别引入到LC13-WT、JM22-WT和1G4-WT分子中,将引入突变后得到的分子分别命名为LC13-sTv、JM22-sTv和1G4-sTv,被引入的疏水芯以带下划线的加粗字母表示。其中,LC13-sTv的 α 链和 β 链可变域氨基酸序列分别为SEQ ID NO:35和SEQ ID NO:36,如图13a和13b所示,其 α 链可变域中引入的疏水芯为11L、13V、21I和91I,其 β 链可变域中引入的疏水芯为94L;JM22-sTv的 α 链和 β 链可变域氨基酸序列分别为SEQ ID NO:37和SEQ ID NO:38,如图14a和14b所示,其 α 链可变域中引入的疏水芯为19V和21I,其 β 链可变域中引入的疏水芯为91I和94L;1G4-sTv的 α 链和 β 链可变域氨基酸序列分别为SEQ ID NO:39和SEQ ID NO:40,如图15a和15b所示,其 α 链可变域中引入的疏水芯为19V和21I,其 β 链可变域中引入的疏水芯为19V、91I、94L和J基因倒数第6位为T。上述位置编号采用IMGT中列出的位置编号。构建上述单链分子所用的连接短肽(linker)可以为任何合适的序列,本发明优选的氨基酸序列

为SEQ ID NO:41,如图16所示。

[0281] 实施例6 蛋白LC13-WT与LC13-sTv的稳定性测试

[0282] 采用实施例3中所述的方法对蛋白LC13-WT和LC13-sTv进行表达、复性、纯化,凝胶过滤柱纯化后跑SDS-PAGE胶,并用凝胶过滤法作出2种蛋白的SEC图谱,同时计算其表达量、纯化后所得蛋白量和蛋白复性收率。其中,表达量为1L大肠杆菌诱导表达并提纯后的包涵体的产量。纯化后所得蛋白量为1L大肠杆菌诱导表达并提纯后所得包涵体经复性、纯化后得到的蛋白的量。蛋白复性收率的计算式如下:蛋白复性收率(%)=100*纯化后所得蛋白量(mg)/复性所用包涵体的量(mg)。在本发明中提及的表达量和蛋白复性收率均按上述计算方法进行计算,有特别说明的除外。

[0283] 利用美国TA(waters)公司的差示扫描量热仪(Nano DSC)测定上述纯化后蛋白LC13-WT与LC13-sTv的T_m值。其扫描范围为10-90℃,升温速率为1℃/min,上样量为900μL。其中,T_m值是通过分析软件Nanoanalyze的拟合模型TwostateScaled拟合而得到。

[0284] 下表3列出了LC13-WT与LC13-sTv的表达量、纯化后所得蛋白量及蛋白复性收率的数据。

[0285] 表3

[0286]

蛋白名称	表达量(mg/L)	纯化后所得蛋白量(mg/L)	收率(%)
LC13-WT	231	1.3	0.56%
LC13-sTv	330	66.6	20.2%

[0287] 由上表的数据可知,经纯化后,引入疏水芯突变的LC13-sTv蛋白相较于疏水芯未发生突变的LC13-WT蛋白复性收率提高了35倍。

[0288] 图17为按实施例3中所述经过凝胶过滤柱(Superdex 75 10/300,GE Healthcare)纯化后得到蛋白LC13-WT与LC13-sTv的SDS-PAGE胶图。胶图显示,纯化后得到LC13-WT蛋白形成的条带不均一,而LC13-sTv能够形成单一的条带且纯度很高。说明LC13-sTv的复性情况要远好于LC13-WT。

[0289] 图18a和18b分别为蛋白LC13-WT与LC13-sTv的SEC图谱,从图谱上来看,纯化后的蛋白LC13-WT并未出峰,而LC13-sTv能够形成单一且对称的洗脱峰,说明LC13-sTv的复性要显著优于LC13-WT。

[0290] LC13-WT复性纯化后得到正确构象的蛋白含量极少,没有明显的蛋白去折叠吸热峰,利用分析软件Nanoanalyze得不到其T_m值,而经疏水芯突变后的LC13-sTv的T_m值为43.6℃,其DSC曲线如图47所示。说明LC13-sTv相较于LC13-WT复性能力更强、更抗解折叠、更抗不适当或不希望的折叠以及热稳定性有显著提高。

[0291] 通过蛋白LC13-WT与LC13-sTv的表达量、纯化后所得蛋白量、蛋白复性收率、SDS-PAGE胶图、SEC图谱及T_m值的对比分析可知,经过疏水芯改造的LC13-sTv相较于疏水芯未经改造的LC13-WT复性能力更强、更抗解折叠、更抗不适当或不希望的折叠、蛋白复性收率更高以及热稳定性有显著提高。因此,LC13-sTv相较于LC13-WT稳定性有显著提高。以蛋白复性收率的数据来对稳定性提高的量进行计算,本发明中LC13-sTv相对于LC13-WT稳定性提高了35倍。

[0292] 实施例7 蛋白JM22-WT与JM22-sTv的稳定性测试

[0293] 采用实施例3中所述的方法对蛋白JM22-WT和JM22-sTv进行表达、复性、纯化,凝胶

过滤柱纯化后跑SDS-PAGE胶,并用凝胶过滤法作出2种蛋白的SEC图谱,同时计算其表达量、纯化后所得蛋白量和蛋白复性收率,并利用实施例6中所述方法测定其 T_m 值。

[0294] 下表4列出了JM22-WT与JM22-sTv的表达量、纯化后所得蛋白量及蛋白复性收率的数据。

[0295] 表4

蛋白名称	表达量 (mg/L)	纯化后所得蛋白量 (mg/L)	收率 (%)
JM22-WT	152	0.67	0.4%
JM22-sTv	350	60.04	17.2%

[0297] 由上表的数据可知,经纯化后,引入疏水芯突变的JM22-sTv蛋白相较于疏水芯未发生突变的JM22-WT蛋白复性收率提高了42倍。

[0298] 图19为按实施例3中所述经过凝胶过滤柱(Superdex 75 10/300,GE Healthcare)纯化后得到蛋白JM22-WT和JM22-sTv的SDS-PAGE胶图。胶图显示, JM22-WT复性形成的单体条带不均一,有3个条带,而JM22-sTv能够形成单一条带的单体且纯度很高。说明JM22-sTv的复性情况要远好于JM22-WT。

[0299] 图20a和20b分别为蛋白JM22-WT与JM22-sTv的SEC图谱,从图谱上来看,纯化后的蛋白JM22-WT形成的洗脱峰不单一而且信号很低,而纯化后的JM22-sTv能够形成单一且对称的洗脱峰,说明JM22-sTv的复性情况要显著优于JM22-WT。

[0300] 图48a和48b分别为蛋白JM22-WT与JM22-sTv的DSC曲线图。由于JM22-WT复性纯化后得到正确构象的蛋白含量极少,没有明显的蛋白去折叠吸热峰,利用分析软件Nanoanalyze得不到其 T_m 值,而经疏水芯突变后的JM22-sTv的 T_m 值为43.7°C。由上述DSC曲线图可知, JM22-sTv相较于JM22-WT复性能力更强、更抗解折叠、更抗不适当或不希望的折叠以及热稳定性有显著提高。

[0301] 通过蛋白JM22-WT与JM22-sTv的表达量、纯化后所得蛋白量、蛋白复性收率、SDS-PAGE胶图、DSC曲线图及SEC图谱的对比分析可知,经过疏水芯改造的JM22-sTv相较于疏水芯未经改造的JM22-WT复性能力更强、更抗解折叠、更抗不适当或不希望的折叠以及热稳定性有显著提高同时蛋白复性收率也有明显提高。因此,本发明JM22-sTv相较于JM22-WT稳定性有显著提高。以蛋白复性收率的数据来对稳定性提高的量进行计算,本发明中JM22-sTv相对于JM22-WT稳定性提高了4200%。

[0302] 实施例8 蛋白1G4-WT与1G4-sTv的稳定性测试

[0303] 采用实施例3中所述的方法对蛋白1G4-WT和1G4-sTv进行表达、复性、纯化,凝胶过滤柱纯化后跑SDS-PAGE胶,并用凝胶过滤法作出2种蛋白的SEC图谱,同时计算其表达量、纯化后所得蛋白量和收率。

[0304] 下表5列出了1G4-WT与1G4-sTv的表达量、纯化后所得蛋白量及蛋白复性收率的数据。

[0305] 表5

蛋白名称	表达量 (mg/L)	纯化后所得蛋白量 (mg/L)	收率 (%)
1G4-WT	290	8.08	2.8%
1G4-sTv	388	38.8	10%

[0307] 由上表的数据可知,经纯化后,引入疏水芯突变的1G4-sTv蛋白相较于疏水芯未发

生突变的1G4-WT蛋白复性收率提高了2.6倍。

[0308] 图21为按实施例3中所述经过凝胶过滤柱(Superdex 75 10/300,GE Healthcare)纯化后得到蛋白1G4-WT和1G4-sTv的SDS-PAGE胶图。胶图显示,纯化后得到1G4-WT蛋白形成的条带不均一,形成了2个条带,而1G4-sTv能够形成单一条带的单体且纯度很高。说明1G4-sTv的复性情况要远好于1G4-WT。

[0309] 图22a和22b分别为蛋白1G4-WT与1G4-sTv的SEC图谱,从图谱上来看,纯化后的蛋白1G4-WT形成的洗脱峰不单一而且信号较低,而纯化后的1G4-sTv能够形成单一且对称的洗脱峰,说明1G4-sTv的复性情况要显著优于1G4-WT。

[0310] 通过蛋白1G4-WT与1G4-sTv的表达量、纯化后所得蛋白量、蛋白复性收率、SDS-PAGE胶图及SEC图谱的对比分析可知,经过疏水芯改造的1G4-sTv相较于疏水芯未经改造的1G4-WT具有更强的复性能力、更高的表达量、更高的蛋白复性收率。因此,本发明1G4-sTv相较于1G4-WT稳定性有显著提高。以蛋白复性收率的数据来对稳定性提高的量进行计算,本发明中1G4-sTv相对于1G4-WT稳定性提高了260%。

[0311] 实施例9 以1G4-sTv为模板对分子的稳定性进一步优化

[0312] 以1G4-sTv为模板对其疏水芯及可变域的表面氨基酸残基进行突变,构建文库并筛选高稳定性的分子。需要进行突变的疏水芯位点已在序列SEQ ID NO:42中以带下划线的黑体字标出,需要进行突变的表面氨基酸残基以黑体字标出,如图23所示。

[0313] 文库构建所采用的基本方法已经在实施例4中有所描述。在本实施例中,针对需要进行突变的位点构建3个文库,需要突变的疏水芯位点全部在文库1中,文库2和3是针对表面氨基酸残基而构建的。更具体地,以1G4-sTv质粒作为模板,以设计好的突变引物进行重叠PCR(Overlap PCR)得到突变DNA片段后,通过NcoI/NotI酶切,将片段克隆至基于pUC19骨架的噬菌体质粒载体pLitmus28(NEB)中。连接后的DNA电转TG1感受态细胞(lucigen),得到共3个噬菌体质粒载体文库,其库容按菌落数计约为 1×10^9 - 3×10^9 。分别将这3个文库生长出的菌苔刮下,加入至终浓度为20%的甘油于-80℃保存。以下表8、表9和表10分别为针对文库1、文库2和文库3所设计的引物。

[0314] 表6 构建文库1所设计的引物

[0315]

引物名称	引物序列(5' -3')	SEQ ID NO:
L1-01	CCGGCCATGGCCAAGCAGGAANTKACGCAATCCCCGTCGTC	43
L1-02	AATCCCCGTCGTC CAVDG TCTVDGCCGGAAGGCGAAAATGTC	44
L1-03	TCGCGGAGTCACCCGGCTGMANTGATTCAATATACAGG	45
L1-04	CAGCCGGGTGACTCCGCGACGTACTTTTGTG	46
L1-05	TTCGGCGTTTGGGTMANACCCGCATTAC	47
L1-06	ACCCAAACGCCGAAATACVDGAGCVDGAAGACGGGTCAGTC	48
L1-07	GCGGAGTCACTCGGGGTMANANTGATTCAATGC	49
L1-08	ACCCCGAGTGACTCCGCADBGTATCTGTGTGCTTCG	50
L1-09	TCGAGTGCGGCCCGTCACCGTCA	51

[0316] 表7 构建文库2所设计的引物

引物名称	引物序列 (5' -3')	SEQ ID NO:
[0317] L2-01	AGCCGGCCATGGCCAAGCAGGAAGTCAC	52
L2-02	GATTGAGACATTTTCMYTTCCGGGACAG	53
L2-03	GTCACTGTCTGTCCCGAARRKGAATAATGTCTCAATC	54
L2-04	CACAAAAGTACGTCGCMYYGTCMYTCGGCTGCGATGAT	55
L2-05	CGACGTACTIONTTTGTGCGGTTTCGTCC	56
L2-06	CAGCTTCGTACCCCTTGCCGAAGGTC	57
[0318] L2-07	TTCGGCAAGGGTACGAAGCTGRRKGTACACGCC	58
L2-08	CATTGCAGGGTCACMYCTGMYTCGMYTCAGGCTCTGGT	59
L2-09	GTGACCCTGCAATGCGCCAGGATATG	60
L2-10	CACAGATAAACTGCGGAGTCMYTCGGGGTCAG	61
L2-11	GACTCCGCAGTTTATCTGTGTGCTTCGTCC	62
L2-12	GAGTGCGGCCGCGTCACMYTCAGGCGCGTG	63

[0319] 表8 构建文库3所设计的引物

引物名称	引物序列 (5' -3')	SEQ ID NO:
[0320] L3-01	CCGGCCATGGCCAAGCAGGAAGTCACGCAATCCCCGTCGTC	64
L3-02	ACGCAATCCCCGTCGTCACTGRRKGTCCCGGAAGG	65
L3-03	GGAGTCACCCGGCTGMANMYTTCAATATACAGGGTAC	66
L3-04	CAGCCGGGTGACTCCRRKACGTACTTTTGTGCG	67
L3-05	TTCGCTGCCGCCCCMYTCGTGACGCTCAGCTT	68
L3-06	AAGCTGAGCGTCACGRRKGGGGCGGCAGC	69
L3-07	GCATTGCAGGGTCACAGACTGACCMYCTTCAGGCTC	70
L3-08	GTCAGTCTGTGACCCTGCAATGCGCCAGGATATG	71
L3-09	CTGCGGAGTCACTCGGMYTCAGMYTTCAATGCG	72
L3-10	CCGAGTACTCCGCAGTTTATCTGTGTGCTTCGTCC	73
L3-11	AGTGCGGCCGCMYTCACCGTCAG	74

[0321] 为得到高稳定性的sTv克隆,库中长出的噬菌体在沉淀浓缩后,进行65℃热激处理,同时为进一步加强筛选力度还加入了0.02%的SDS共孵育,而后将此处理过的噬菌体做后续筛选。将于3个库中筛选到的OD值较高的克隆进行组合最终得到11个克隆。

[0322] 实施例10 对实施例9中筛选到的克隆的稳定性验证

[0323] 将实施例9中筛选到的11个克隆按实施例4中所述的ELISA实验步骤检测其OD值并验证抗原特异性,结果如图24所示。此结果显示了11个克隆的OD值均较高,能够与其原配体抗原HLA-A2/SLLMWITQC (NY-ESO-1肿瘤特异性抗原) 特异性结合,与其他无关抗原基本没有结合。这些通过噬菌体展示检测到的sTv与抗原HLA-A2/SLLMWITQC的结合不应是由于其亲和力和较野生的TCR强的原因,这一点在实施例11得到了证明。

[0324] 根据IMGT中列出的位置编号,上述11个突变株在下列一个或多个疏水芯位置发生

了突变： α 链可变区第11位、第13位或第94位和/或 β 链可变区第11位、第13位或第94位。具体地，其包含一个或多个下列 α 链可变区疏水芯氨基酸残基11M、11E、13R、13K、94V或94I和/或 β 链可变区疏水芯氨基酸残基11L、11V、13V或94V。除了疏水芯外，我们筛选到的克隆还包含一个或多个下列 α 链可变区氨基酸残基4L、12N、16S、93N、93R、97N、100G、105S或 α 链J基因倒数第1位是D和/或包含 β 链可变区氨基酸残基4I、101L、 β 链J基因倒数第1位是D或倒数第3位是E。

[0325] 筛选到的高稳定性的上述克隆的 α 链可变域的氨基酸序列 (SEQ ID NO:75-85) 和 β 链可变域氨基酸序列 (SEQ ID NO:86-96) 分别如图25和图26所示。

[0326] 采用实施例2和实施例3中所述的方法对筛选到的11个克隆进行连接、表达、复性和纯化。利用美国TA (waters) 公司的差示扫描量热仪 (Nano DSC) 测定上述11种克隆的 T_m 值。其扫描范围为10-90°C，升温速率为1°C/min，上样量为900 μ L。其中， T_m 值是通过分析软件Nanoanalyze的拟合模型TwostateScaled拟合而得到。结果如图27及表9所示，其 T_m 值均不小于37.9°C，并具有明显的蛋白去折叠吸热峰。而与上述克隆的表达、复性、纯化过程及DSC实验条件完全相同的1G4-WT的DSC结果如图28所示，从图中可以看出，其没有明显的蛋白去折叠的吸热峰，说明正确构象的蛋白含量极少。对比上述11个克隆的DSC图谱与1G4-WT的DSC图谱结果可知，筛选到的克隆相较于1G4-WT更抗解折叠、更抗不适当或不希望的折叠、复性能力更强以及热稳定性显著增加。因此，我们筛选到的克隆的稳定性要远远高于疏水芯未经突变的1G4-WT。

[0327] 由于上述1G4-WT复性纯化后得到正确构象的蛋白含量极少，没有明显的蛋白去折叠吸热峰，利用软件得不到其 T_m 值，而上述疏水芯突变TCR具有约38°C或更高的 T_m 值，这提示，本发明的上述G3-G7以及G9-G14等11种突变TCR的稳定性都有极其显著的提高（至少提高1倍）。

[0328] 表9

克隆名称	α 与 β 链可变域氨基酸序列		T _m (°C)
	α	β	
G3	75	86	37.90
G4	76	87	48.22
G5	77	88	41.89
G6	78	89	48.30
[0329] G7	79	90	43.33
G9	80	91	49.55
G10	81	92	40.01
G11	82	93	46.57
G12	83	94	44.32
G13	84	95	49.63
G14	85	96	47.70

[0330] 本领域技术人员可以对上述筛选到的高稳定性突变点进行重新组合来构建新的稳定性突变株。我们对上述突变点进行重新组合,构建出了新的α链可变域(SEQ ID NO:97)和β链可变域(SEQ ID NO:98),其氨基酸序列分别如图29a和图29b所示。以此α链可变域和β链可变域构建sTv分子,命名为G15。

[0331] 实施例11 1G4-WT突变株稳定性的进一步测试

[0332] 采用实施例3中所述的方法对实施例10中所述的突变株G9、G13和G15进行表达、复性、纯化,凝胶过滤柱纯化后跑SDS-PAGE胶,并用凝胶过滤法作出3种蛋白的SEC图谱,同时计算其表达量、纯化后所得蛋白量和蛋白复性收率,并与1G4-WT进行比较。

[0333] 表10列出了1G4-WT、G9、G13和G15的表达量、纯化后所得蛋白量及蛋白复性收率的数据。

[0334] 表10

蛋白名称	表达量 (mg/L)	纯化后所得蛋白量 (mg/L)	收率 (%)
[0335] 1G4-WT	290	8.08	2.8%
G9	356	55.18	15.5%
[0336] G13	223	101.15	45.4%
G15	279	129.7	46.5%

[0337] 由上表的数据可知,经纯化后,突变株G9、G13和G15相较于1G4-WT蛋白复性收率均有显著提高,分别提高了4.5倍、15.2倍和15.6倍。

[0338] 图30为按实施例3中所述经过凝胶过滤柱(Superdex 75 10/300,GE Healthcare)

纯化后得到蛋白1G4-WT、G9、G13和G15的SDS-PAGE胶图。胶图显示,纯化后得到1G4-WT蛋白形成的条带不均一,而经过改造的G9、G13和G15均能够形成单一条带的单体且纯度很高。说明G9、G13和G15的复性情况均要好于1G4-WT。

[0339] 图31a、31b和31c分别为蛋白G9、G13和G15的SEC图谱,从图22a的1G4-WT的SEC图谱可知,纯化后的蛋白1G4-WT形成的洗脱峰不单一而且信号较低,而纯化后的G9、G13和G15均能够形成单一且对称的洗脱峰,说明G9、G13和G15的复性情况均要显著优于1G4-WT。

[0340] 采用实施例10中所述方法测定G15的 T_m 值为46.6°C,其DSC曲线图如图46所示。而根据实施例10中的测定结果,突变株G9和G13的 T_m 值也相对较高,分别为49.55°C和49.63°C。

[0341] 使用BIAcore T200实时分析系统检测蛋白G9、G13和G15与其配体的结合,结果显示3种sTv蛋白与抗原HLA-A2/SLLMWITQC的亲合力并不优于野生型1G4TCR与该抗原的结合,野生型1G4TCR结合抗原HLA-A2/SLLMWITQC的解离平衡常数是32 μ M(参照Li等((2005) Nature Biotech 23(3):349-354))。

[0342] 通过蛋白1G4-WT与G9、G13和G15的表达量、纯化后所得蛋白量、蛋白复性收率、SDS-PAGE胶图及SEC图谱的对比分析可知,经过疏水芯改造的突变株的复性能力、热稳定性和蛋白复性收率均要远远高于疏水芯未经改造的1G4-WT。因此,经疏水芯改造的突变株的稳定性相较于1G4-WT有显著提高。以蛋白复性收率的数据来对稳定性提高的量进行计算,本发明中G9、G13和G15相对于1G4-WT稳定性分别提高了450%、1520%和1560%。

[0343] 实施例12 构建疏水芯突变的高稳定性sTv分子

[0344] 根据实施例9中筛选到的高稳定性变体的疏水芯及可变区骨架的表面氨基酸残基构建高稳定性sTv分子。

[0345] 将实施例9中筛选到的高稳定性变体的部分疏水芯及可变区骨架的表面氨基酸残基通过本领域技术人员熟知的定点突变的方法分别引入到LC13-WT、JM22-WT和MAGE-sTv-WT分子中,将引入突变后得到的分子分别命名为LC13-G9、LC13-G15、JM22-G9、JM22-G15和MAGE-G15,被引入的疏水芯以带下划线的加粗字母表示。

[0346] 其中,LC13-G9的 α 链和 β 链可变域氨基酸序列分别为SEQ ID NO:99和SEQ ID NO:100,如图32a和32b所示,其 α 链可变域中引入的疏水芯为13V、21I、91I和94I其 β 链可变域中引入的疏水芯为11V、13V和94V;LC13-G15的 α 链和 β 链可变域氨基酸序列分别为SEQ ID NO:101和SEQ ID NO:102,如图33a和33b所示,其 α 链可变域中引入的疏水芯为11L、13V、21I、91I和94I,其 β 链可变域中引入的疏水芯为11L、13V和94V;JM22-G9的 α 链和 β 链可变域氨基酸序列分别为SEQ ID NO:103和SEQ ID NO:104,如图34a和34b所示,其 α 链可变域中引入的疏水芯为11M、13V、19V、21I和94I,其 β 链可变域中引入的疏水芯为11V、13V、91I和94V;JM22-G15的 α 链和 β 链可变域氨基酸序列分别为SEQ ID NO:105和SEQ ID NO:106,如图35a和35b所示,其 α 链可变域中引入的疏水芯为13V、19V、21I和94I,其 β 链可变域中引入的疏水芯为13V、91I和94V;MAGE-G15的 α 链和 β 链可变域氨基酸序列分别为SEQ ID NO:107和SEQ ID NO:108,如图42a和42b所示,其 α 链可变域中引入的疏水芯为19V、21I和94I,其 β 链可变域中引入的疏水芯为13V、89L、91I和94V。

[0347] 上述位置编号采用IMGT中列出的位置编号。构建上述单链分子所用的连接短肽(linker)可以为任何合适的序列,本发明优选的氨基酸序列为SEQ ID NO:41,如图16所示。

[0348] 实施例13 蛋白LC13-G9与LC13-G15的稳定性测试

[0349] 采用实施例3中所述的方法对蛋白LC13-G9和LC13-G15进行表达、复性、纯化,凝胶过滤柱纯化后跑SDS-PAGE胶,并用凝胶过滤法作出2种蛋白的SEC图谱,同时计算其表达量、纯化后所得蛋白量和蛋白复性收率。

[0350] 下表11列出了LC13-G9与LC13-G15的表达量、纯化后所得蛋白量及蛋白复性收率方面的数据,同时列出了LC13-WT的相关数据,以便分析。

[0351] 表11

[0352]	蛋白名称	表达量 (mg/L)	纯化后所得蛋白量 (mg/L)	收率 (%)
	LC13-WT	231	1.3	0.56%
[0353]	LC13-G9	233	1.37	0.59%
	LC13-G15	185	61.05	33%

[0354] 由上表的数据可知,经纯化后,LC13-G9蛋白和LC13-G15蛋白相较于疏水芯未发生突变的1G4-WT蛋白复性收率分别提高了5.4%和57.9倍。

[0355] 图36为按实施例3中所述经过凝胶过滤柱 (Superdex 75 10/300, GE Healthcare) 纯化后得到蛋白LC13-G9和LC13-G15的SDS-PAGE胶图。胶图显示,LC13-WT形成的条带不均一,而经过改造的LC13-G9和LC13-G15均能形成单一条带的单体且纯度很高。说明LC13-G9和LC13-G15的复性情况要远好于LC13-WT。

[0356] 图37和38分别为蛋白LC13-G9与LC13-G15的SEC图谱,LC13-WT的SEC图谱显示其并未出峰,而蛋白LC13-G9与LC13-G15均能够形成单一且对称的洗脱峰,说明LC13-G9与LC13-G15的复性情况均要显著优于LC13-WT。

[0357] 采用实施例10中所述方法测定蛋白LC13-G9与LC13-G15的 T_m 值,图49a和图49b分别为蛋白LC13-G9与LC13-G15的DSC曲线图,其 T_m 值分别为43°C和50.5°C。而LC13-WT由于复性后得到正确构象的蛋白含量很低,没有明显的蛋白去折叠吸热峰,无法得到其 T_m 值。这说明,本发明LC13-G9与LC13-G15的热稳定性相对于LC13-WT提高了至少一倍。同时说明,本发明LC13-G9与LC13-G15相较于LC13-WT更抗解折叠、更抗不适当或不希望的折叠、复性能力更强。

[0358] 通过蛋白LC13-G9与LC13-G15的表达量、纯化后所得蛋白量、蛋白复性收率、SDS-PAGE胶图、DSC曲线图及SEC图谱与LC13-WT的相关数据对比分析可知,经过疏水芯改造的LC13-G9与LC13-G15相较于疏水芯未经改造的LC13-WT更抗解折叠、更抗不适当或不希望的折叠、复性能力更强、热稳定性更高、蛋白复性收率更高。因此,本发明LC13-G9与LC13-G15相较于LC13-WT稳定性有显著提高。以蛋白复性收率的数据来对稳定性提高的量进行计算,本发明中LC13-G9与LC13-G15相对于LC13-WT稳定性分别提高了5.4%和57.9倍。

[0359] 实施例14 蛋白JM22-G9与JM22-G15的稳定性测试

[0360] 采用实施例3中所述的方法对蛋白JM22-G9和JM22-G15进行表达、复性、纯化,凝胶过滤柱纯化后跑SDS-PAGE胶,并用凝胶过滤法作出2种蛋白的SEC图谱,同时计算其表达量、纯化后所得蛋白量和蛋白复性收率。

[0361] 下表12列出了JM22-G9与JM22-G15的表达量、纯化后所得蛋白量及蛋白复性收率

的数据,同时列出了JM22-WT的相关数据,以便分析。

[0362] 表12

蛋白名称	表达量 (mg/L)	纯化后所得蛋白量 (mg/L)	收率 (%)
JM22-WT	152	0.67	0.4%
JM22-G9	358	42.2	11.8%
JM22-G15	240	123.18	51.3%

[0364] 由上表的数据可知,经纯化后,JM22-G9蛋白和JM22-G15蛋白相较于疏水芯未发生突变的JM22-WT蛋白复性收率分别提高了28.5倍和127.25倍。

[0365] 图39为按实施例3中所述经过凝胶过滤柱(Superdex 75 10/300,GE Healthcare)纯化后得到蛋白JM22-G9和JM22-G15的SDS-PAGE胶图。胶图显示,JM22-WT复性形成的单体条带不均一,有3个条带,而经过改造的JM22-G9和JM22-G15均能形成单一条带的单体且纯度很高。说明JM22-G9和JM22-G15的复性情况要远好于JM22-WT。

[0366] 图40和41分别为蛋白JM22-G9与JM22-G15的SEC图谱,JM22-WT的SEC图谱显示其形成的洗脱峰不单一而且信号很低,而蛋白JM22-G9与JM22-G15基本能够形成单一且对称的洗脱峰,进一步说明JM22-G9与JM22-G15的复性情况均要显著优于JM22-WT。

[0367] 通过蛋白JM22-G9与JM22-G15的表达量、纯化后所得蛋白量、蛋白复性收率、SDS-PAGE胶图及SEC图谱与JM22-WT的相关数据对比分析可知,经过疏水芯改造的JM22-G9与JM22-G15相较于疏水芯未经改造的JM22-WT具有更强的复性能力、更高的表达量和蛋白复性收率。因此,本发明JM22-G9与JM22-G15相较于JM22-WT稳定性有显著提高。以蛋白复性收率的数据来对稳定性提高的量进行计算,本发明中JM22-G9与JM22-G15相对于JM22-WT稳定性分别提高了28.5倍和127.25倍。

[0368] 实施例15 蛋白MAGE-sTv-WT与MAGE-G15的稳定性测试

[0369] 采用实施例3中所述的方法对蛋白MAGE-G15进行表达、复性、纯化,凝胶过滤柱纯化后跑SDS-PAGE胶,并用凝胶过滤法作出蛋白的SEC图谱,同时计算其表达量、纯化后所得蛋白量和蛋白复性收率。

[0370] 下表13列出了MAGE-sTv-WT与MAGE-G15的表达量、纯化后所得蛋白量及蛋白复性收率的数据。

[0371] 表13

蛋白名称	表达量 (mg/L)	纯化后所得蛋白量 (mg/L)	收率 (%)
MAGE-sTv-WT	270	0	0
MAGE-G15	220	19.8	9%

[0373] 蛋白MAGE-sTv-WT经实施例3中所述的凝胶过滤柱后,没有得到目标组分,因此无法得到其SDS-PAGE胶图、SEC图谱和DSC曲线图(T_m值)。

[0374] 而经过疏水芯改造后的MAGE-G15经凝胶过滤柱(Superdex 75 10/300,GE Healthcare)纯化后得到蛋白的SDS-PAGE胶图如图43所示。该胶图显示,MAGE-G15能够形成单一条带且纯度很高,说明蛋白MAGE-G15的复性能力要远远强于MAGE-sTv-WT。同时,图44所示的MAGE-G15的SEC图谱,具有单一且对称的洗脱峰,也能够说明蛋白MAGE-G15的复性能力要远远强于MAGE-sTv-WT。

[0375] 图45为蛋白MAGE-G15的DSC曲线图,利用分析软件Nanoanalyze的拟合模型

TwostateScaled拟合得到其 T_m 值为46.7°C。

[0376] 使用BIAcore T200实时分析系统检测蛋白MAGE-G15与其配体的结合,结果显示,蛋白MAGE-G15与其配体的亲和力并不优于其相对应的野生型TCR,其 K_D 值为30.4 μ M。

[0377] 以蛋白复性收率的数据来对稳定性提高的量进行计算,从表13中可以看出,本发明的MAGE-G15相较于MAGE-sTv-WT稳定性提高了无穷大倍(至少10000倍)。

[0378] 由以上数据可知,本发明的MAGE-G15的复性能力、蛋白复性收率及热稳定性相较于MAGE-sTv-WT都有极其显著的提高,因此本发明MAGE-G15的稳定性相较于MAGE-sTv-WT有了显著的提高。

[0379] 实施例16 质谱分析

[0380] 我们构建的蛋白经过凝胶过滤柱(Superdex 75 10/300,GE Healthcare)纯化后通过质谱仪测定其全蛋白分子量,并分析质谱测定的分子量与其理论分子量是否相符,以此检验纯化后得到的蛋白序列与原设计序列是否相同。

[0381] 利用美国AB SCIEX公司的质谱仪(Eksigent nano LC(nanoflex)-Triple TOF 5600液质联用系统)测定样品的全蛋白分子量。用10%乙腈(FisherA955-4)、1%甲酸(Fisher A11750)和水(Sigma39253-1L-R)对样品稀释后上质谱分析。系统分析条件如下:

[0382] LC部分

[0383] AB SCIEX的Eksigent nano LC(nanoflex)

[0384] 保护柱:C4-3 μ m300Å200 μ m×0.5mm;Lot 804-00019

[0385] 分析柱:C4;3 μ m,300Å;75 μ m*15cm,Lot 804-00018

[0386] 流动相A:2%乙腈,0.1%甲酸

[0387] 流动相B:98%乙腈,0.1%甲酸

[0388] 流速:300nl/min

[0389] 梯度:10分钟内B液的比例从5%升至90%,总运行时间为30分钟。

[0390] 质谱部分

[0391] 带有Nanospray源的Triple TOF 5600分析柱子中的洗脱液,

[0392] 数据采集方法:正离子MS,

[0393] 数据采集范围:400-200m/z。

[0394] 采集到的质谱数据经Bioanalyst软件去卷积处理后得到样品的完整蛋白分子量信息。

[0395] 经分析,本发明中构建的分子经表达、复性和纯化后,利用质谱仪测定的全蛋白分子量与其理论分子量均相符,说明纯化后得到的蛋白序列与原设计蛋白序列相同。

[0396] 本发明筛选到的疏水芯能够显著提高TCR分子的稳定性。同时,上述实施例证明将本发明筛选到的疏水芯引入到其他的TCR分子中也能够起到增强稳定性的作用。

[0397] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考,就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解,在阅读了本发明的上述讲授内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

序列表

<110> 广州市香雪制药股份有限公司

李懿

<120> 高稳定性的 T 细胞受体及其制法和应用

<130> P2014-0668

<150> 201310263384.1

<151> 2013-06-26

<160> 108

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 1

aacaggagtg acgcagtctc cttcatctgt gagtg 35

<210> 2

[0001] <211> 37

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 2

ttagcgcctat ggcccaaaaa caggaggtga cgcagtc 37

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 3

gaatcttctc agcccgggga c 21

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 4

cgggctgaga agattcaatg 20

<210> 5
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <400> 5
 gccaccgcca gatccaccgg gccctggagt gaccgag 37
 <210> 6
 <211> 66
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <400> 6
 gtggatctgg cggcggcggg gaaggcggg gtggaagcgg cggcggaggc gaaggaggct 60
 ccggag 66
 <210> 7
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0002] <400> 7
 gccaaggagg ctccggaggc aaggctggag tcaactcaaac 40
 <210> 8
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <400> 8
 ctagatgcgg ccgcctctgt gaccgtgagc ctg 33
 <210> 9
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <400> 9
 Lys Gln Glu Val Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Val Pro Glu Gly
 1 5 10 15
 Glu Asn Leu Val Leu Asn Cys Ser Phe Thr Asp Ser Ala Ile Tyr Asn
 20 25 30

Leu Gln Trp Phe Arg Gln Asp Pro Gly Lys Gly Leu Thr Ser Leu Leu
35 40 45

Leu Val Arg Pro Tyr Gln Arg Glu Gln Thr Ser Gly Arg Leu Asn Ala
50 55 60

Ser Leu Asp Lys Ser Ser Gly Arg Ser Thr Leu Tyr Ile Glu Ser Ser
65 70 75 80

Gln Pro Gly Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Arg Pro Gly Gly
85 90 95

Ala Gly Ser Tyr Gln Leu Thr Phe Gly Lys Gly Thr Lys Leu Ser Val
100 105 110

Thr Pro

<210> 10

<211> 342

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 10

[0003]

aaacaggagg tgacgcagtc tccttcactct ctgagtgtcc cagaaggaga aaactgtct 60
ctcaactgca gtttactga tagcgtatt tacaacctcc agtggttag gcaggacct 120
gggaaaggtc tcacatctct gttgtagtg cgccgtatc agagagagca aacaagtga 180
agacttaatg cctcgtgga taaatcatca ggacgtagta cttatacat tgaatctct 240
cagcccgggg actcagccac ctacctctgt getgtgagc cgggaggggc tgggagttac 300
caactcaact tcgggaagg gaccaaactc tcggtcactc ca 342

<210> 11

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 11

Lys Ala Gly Val Thr Gln Thr Pro Arg Tyr Leu Ser Lys Thr Arg Gly
1 5 10 15

Gln Gln Val Thr Leu Ser Cys Ser Pro Ile Ser Gly His Arg Ser Val
20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Gln Phe Leu Phe Glu
35 40 45

Tyr Phe Ser Glu Thr Gln Arg Asn Lys Gly Asn Phe Pro Gly Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Arg Gln Phe Ser Asn Ser Arg Ser Glu Met Asn Val Ser Thr

65 70 75 80

Leu Glu Leu Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Pro Asn

85 90 95

Met Ala Asp Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu Thr Val Thr

100 105 110

<210> 12

<211> 336

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 12

aagctggag tcaactcaaac tccaagatat ctgtccaaaa cgagaggaca gcaagtgaca 60

ctgagctgct ccctatctc tgggcatagg agtgtatcct ggtaccaaca gaccccagga 120

cagggcctc agttcctt tgaatactc agtgagacac agagaaacaa aggaaactc 180

cctggtcgat tctcagggcg ccagttctct aactctcgct ctgagatgaa tgtgagcacc 240

ttggagetgg gggactcggc cctttatct tgcgccagca gcccgaacat ggccgacgag 300

cagtactcg ggccgggcac caggctcacg gtcaca 336

<210> 13

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 13

Gly Pro Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Gly Gly Gly Gly Ser Gly

1 5 10 15

Gly Gly Gly Glu Gly Gly Ser Gly Gly

20 25

<210> 14

<211> 75

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 14

gggcccggg gatctggcgg tggcggtgaa ggcgggtgtg gaagcggcgg cggaggcgaa 60

ggagctccg gaggc 75

[0004]

<210> 15

<211> 114

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 15

Lys Gln Glu Val Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Val Pro Glu Gly

1 5 10 15

Glu Asn Val Ser Ile Asn Cys Ser Phe Thr Asp Ser Ala Ile Tyr Asn

20 25 30

Leu Gln Trp Phe Arg Gln Asp Pro Gly Lys Gly Leu Thr Ser Leu Leu

35 40 45

Leu Val Arg Pro Tyr Gln Arg Glu Gln Thr Ser Gly Arg Leu Asn Ala

50 55 60

Ser Leu Asp Lys Ser Ser Gly Arg Ser Thr Leu Tyr Leu Glu Ser Ser

65 70 75 80

Gln Pro Gly Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Arg Pro Gly Gly

85 90 95

[0005]

Ala Gly Ser Tyr Gln Leu Thr Phe Gly Lys Gly Thr Lys Leu Ser Val

100 105 110

Thr Pro

<210> 16

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 16

Lys Ala Gly Val Thr Gln Thr Pro Arg Tyr Leu Ser Lys Thr Arg Gly

1 5 10 15

Gln Gln Val Thr Leu Ser Cys Ser Pro Ile Ser Gly His Arg Ser Val

20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Gln Phe Leu Phe Glu

35 40 45

Tyr Phe Ser Glu Thr Gln Arg Asn Lys Gly Asn Phe Pro Gly Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Arg Gln Phe Ser Asn Ser Arg Ser Glu Met Asn Phe Ser Thr

65 70 75 80
Leu Glu Leu Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Pro Asn
85 90 95
Met Ala Asp Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Met Thr Val Thr
100 105 110
<210> 17
<211> 114
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 17
Lys Gln Glu Val Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Val Pro Glu Gly
1 5 10 15
Glu Asn Val Ser Ile Asn Cys Ser Phe Thr Asp Ser Ala Ile Tyr Asn
20 25 30
Leu Gln Trp Phe Arg Gln Asp Pro Gly Lys Gly Leu Thr Ser Leu Leu
35 40 45
[0006] Leu Val Arg Pro Tyr Gln Arg Glu Gln Thr Ser Gly Arg Leu Asn Ala
50 55 60
Ser Leu Asp Lys Ser Ser Gly Arg Ser Thr Leu Tyr Ile Glu Ser Ser
65 70 75 80
Gln Pro Gly Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Arg Pro Gly Gly
85 90 95
Ala Gly Ser Tyr Gln Leu Thr Phe Gly Lys Gly Thr Lys Leu Ser Val
100 105 110
Thr Pro
<210> 18
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 18
Lys Ala Gly Val Thr Gln Thr Pro Arg Tyr Leu Ser Lys Thr Arg Gly
1 5 10 15
Gln Gln Val Thr Leu Ser Cys Ser Pro Ile Ser Gly His Arg Ser Val
20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Gln Phe Leu Phe Glu
35 40 45

Tyr Phe Ser Glu Thr Gln Arg Asn Lys Gly Asn Phe Pro Gly Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Arg Gln Phe Ser Asn Ser Arg Ser Glu Met Asn Ile Ser Thr
65 70 75 80

Leu Glu Leu Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Pro Asn
85 90 95

Met Ala Asp Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu Thr Val Thr
100 105 110

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 19

gttttctcct tctgggacac 20

<210> 20

[0007]

<211> 43

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> misc_feature

<222> (19)..(19)

<223> n is a, c, g 或 t

<220>

<221> misc_feature

<222> (25)..(25)

<223> n is a, c, g 或 t

<400> 20

gtcccagaag gagaaaaacnt ktctntkaac tgcagtttca ctg 43

<210> 21

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 21
gtataaagta ctacgtcctg atg 23
<210> 22
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> misc_feature
<222> (21)..(21)
<223> n is a, c, g 或 t
<400> 22
caggacgtag tactttatac ntkgaatctt ctcagc 36
<210> 23
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0008] <400> 23
ttgctgcct ctcgttttgg ac 22
<210> 24
<211> 43
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(20)
<223> n is a, c, g 或 t
<220>
<221> misc_feature
<222> (26)..(26)
<223> n is a, c, g 或 t
<400> 24
caaaacgaga ggacagcaan tkacantkag ctgetccct atc 43
<210> 25

<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 25
attcatctca gagcgagag 19
<210> 26
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> n is a, c, g 或 t
<400> 26
ctcgtctga gatgaatnk agcaccttg agctg 35
<210> 27
[0009] <211> 42
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(20)
<223> n is a, c, g 或 t
<400> 27
gccgcctctg tgaccgtman cctmrkgccc ggcccgaagt ac 42
<210> 28
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 28
acggtcacag aggcggccgc atctagaatt c 31
<210> 29
<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 29

Asp Ala Lys Thr Thr Gln Pro Asn Ser Met Glu Ser Asn Glu Glu Glu
1 5 10 15

Pro Val His Leu Pro Cys Asn His Ser Thr Ile Ser Gly Thr Asp Tyr
20 25 30

Ile His Trp Tyr Arg Gln Leu Pro Ser Gln Gly Pro Glu Tyr Val Ile
35 40 45

His Gly Leu Thr Ser Asn Val Asn Asn Arg Met Ala Ser Leu Ala Ile
50 55 60

Ala Glu Asp Arg Lys Ser Ser Thr Leu Ile Leu His Arg Ala Thr Leu
65 70 75 80

Arg Asp Ala Ala Val Tyr Tyr Cys Ile Leu Arg Asp Ala Gly Gly Thr
85 90 95

Ser Tyr Gly Lys Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Ile Leu Thr Val His
100 105 110

[0010]

Pro

<210> 30

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 30

Gly Ala Gly Val Ser Gln Ser Pro Arg Tyr Lys Val Ala Lys Arg Gly
1 5 10 15

Gln Asp Val Ala Leu Arg Cys Asp Pro Ile Ser Gly His Val Ser Leu
20 25 30

Phe Trp Tyr Gln Gln Ala Leu Gly Gln Gly Pro Glu Phe Leu Thr Tyr
35 40 45

Phe Gln Asn Glu Ala Gln Leu Asp Lys Ser Gly Leu Pro Ser Asp Arg
50 55 60

Phe Phe Ala Glu Arg Pro Glu Gly Ser Val Ser Thr Leu Lys Ile Gln
65 70 75 80

Arg Thr Gln Gln Glu Asp Ser Ala Val Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Leu

85 90 95
Gly Gln Ser Tyr Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu Thr Val
100 105 110
Thr
<210> 31
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 31
Thr Gln Leu Leu Glu Gln Ser Pro Gln Phe Leu Ser Ile Gln Glu Gly
1 5 10 15
Glu Asn Leu Thr Val Tyr Cys Asn Ser Ser Ser Val Phe Ser Ser Leu
20 25 30
Gln Trp Tyr Arg Gln Glu Pro Gly Glu Gly Pro Val Leu Leu Val Thr
35 40 45
Val Val Thr Gly Gly Glu Val Lys Lys Leu Lys Arg Leu Thr Phe Gln
50 55 60
[0011] Phe Gly Asp Ala Arg Lys Asp Ser Ser Leu His Ile Thr Ala Ala Gln
65 70 75 80
Pro Gly Asp Thr Gly Leu Tyr Leu Cys Ala Gly Gly Gly Ser Gln Gly
85 90 95
Asn Leu Ile Phe Gly Lys Gly Thr Lys Leu Ser Val Lys Pro
100 105 110
<210> 32
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 32
Asp Gly Gly Ile Thr Gln Ser Pro Lys Tyr Leu Phe Arg Lys Glu Gly
1 5 10 15
Gln Asn Val Thr Leu Ser Cys Glu Gln Asn Leu Asn His Asp Ala Met
20 25 30
Tyr Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Gln Gly Leu Arg Leu Ile Tyr Tyr
35 40 45

Ser Gln Ile Val Asn Asp Phe Gln Lys Gly Asp Ile Ala Glu Gly Tyr
50 55 60

Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys Glu Ser Phe Pro Leu Thr Val Thr Ser
65 70 75 80

Ala Gln Lys Asn Pro Thr Ala Phe Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Ile Arg
85 90 95

Ser Ser Tyr Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu Thr Val Thr
100 105 110

<210> 33

<211> 114

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 33

Lys Gln Glu Val Thr Gln Ile Pro Ala Ala Leu Ser Val Pro Glu Gly
1 5 10 15

Glu Asn Leu Val Leu Asn Cys Ser Phe Thr Asp Ser Ala Ile Tyr Asn
20 25 30

[0012]

Leu Gln Trp Phe Arg Gln Asp Pro Gly Lys Gly Leu Thr Ser Leu Leu
35 40 45

Leu Ile Gln Ser Ser Gln Arg Glu Gln Thr Ser Gly Arg Leu Asn Ala
50 55 60

Ser Leu Asp Lys Ser Ser Gly Arg Ser Thr Leu Tyr Ile Ala Ala Ser
65 70 75 80

Gln Pro Gly Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Arg Pro Ala Ser
85 90 95

Gly Gly Ser Tyr Ile Pro Thr Phe Gly Arg Gly Thr Ser Leu Ile Val
100 105 110

His Pro

<210> 34

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 34

Asn Ala Gly Val Thr Gln Thr Pro Lys Phe Gln Val Leu Lys Thr Gly

1 5 10 15
 Gln Ser Met Thr Leu Gln Cys Ala Gln Asp Met Asn His Glu Tyr Met
 20 25 30
 Ser Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Met Gly Leu Arg Leu Ile His Tyr
 35 40 45
 Ser Val Gly Ala Gly Ile Thr Asp Gln Gly Glu Val Pro Asn Gly Tyr
 50 55 60
 Asn Val Ser Arg Ser Thr Thr Glu Asp Phe Pro Leu Arg Leu Leu Ser
 65 70 75 80
 Ala Ala Pro Ser Gln Thr Ser Val Tyr Phe Cys Ala Ser Ser Tyr Val
 85 90 95
 Gly Asn Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly Glu Gly Ser Arg Leu Thr Val
 100 105 110
 Leu
 <210> 35
 <211> 113
 <212> PRT
 [0013] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <400> 35
 Asp Ala Lys Thr Thr Gln Pro Asn Ser Leu Glu Val Asn Glu Glu Glu
 1 5 10 15
 Pro Val His Ile Pro Cys Asn His Ser Thr Ile Ser Gly Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Ile His Trp Tyr Arg Gln Leu Pro Ser Gln Gly Pro Glu Tyr Val Ile
 35 40 45
 His Gly Leu Thr Ser Asn Val Asn Asn Arg Met Ala Ser Leu Ala Ile
 50 55 60
 Ala Glu Asp Arg Lys Ser Ser Thr Leu Tyr Ile His Arg Ala Thr Pro
 65 70 75 80
 Arg Asp Ser Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Val Pro Leu Ala Gly Gly Thr
 85 90 95
 Ser Tyr Gly Lys Leu Thr Phe Gly Lys Gly Thr Lys Leu Ser Val Thr
 100 105 110
 Pro

<210> 36

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 36

Gly Ala Gly Val Ser Gln Ser Pro Arg Tyr Lys Ser Ala Lys Arg Gly

1 5 10 15

Gln Asp Val Thr Leu Arg Cys Asp Pro Ile Ser Gly His Val Ser Leu

20 25 30

Phe Trp Tyr Gln Gln Ala Pro Gly Gln Gly Pro Glu Phe Leu Thr Tyr

35 40 45

Phe Gln Asn Glu Ala Gln Leu Asp Lys Ser Gly Leu Pro Ser Asp Arg

50 55 60

Phe Ser Ala Glu Arg Pro Glu Gly Ser Val Ser Thr Leu Lys Ile Gln

65 70 75 80

Arg Leu Gln Pro Glu Asp Ser Ala Val Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Leu

85 90 95

[0014]

Gly Gln Ala Tyr Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu Thr Val

100 105 110

Thr

<210> 37

<211> 110

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 37

Thr Gln Leu Leu Glu Gln Ser Pro Gln Ser Leu Ser Ile Gln Glu Gly

1 5 10 15

Glu Asn Val Thr Ile Tyr Cys Asn Ser Ser Ser Val Phe Ser Ser Leu

20 25 30

Gln Trp Tyr Arg Gln Glu Pro Gly Glu Gly Pro Thr Leu Leu Val Thr

35 40 45

Val Val Thr Gly Gly Glu Val Lys Lys Leu Lys Arg Leu Thr Phe Gln

50 55 60

Phe Gly Asp Ala Arg Lys Asp Ser Ser Leu His Ile Thr Ser Ala Gln

65 70 75 80
Pro Gly Asp Ser Gly Thr Tyr Phe Cys Ala Val Ala Gly Ser Gln Gly
85 90 95
Asn Leu Ile Phe Gly Lys Gly Thr Lys Leu Ser Val Thr Pro
100 105 110
<210> 38
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 38
Asp Gly Gly Ile Thr Gln Ser Pro Lys Tyr Leu Ser Arg Lys Glu Gly
1 5 10 15
Gln Asn Val Thr Leu Ser Cys Glu Gln Asn Leu Asn His Asp Ala Met
20 25 30
Tyr Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Gln Gly Leu Arg Leu Ile Tyr Tyr
35 40 45
Ser Gln Ile Val Asn Asp Phe Gln Lys Gly Asp Ile Ala Glu Gly Tyr
[0015] 50 55 60
Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys Glu Ser Phe Pro Leu Thr Ile Thr Ser
65 70 75 80
Leu Gln Lys Asn Asp Ser Ala Val Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Ser Arg
85 90 95
Ser Ser Tyr Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu Thr Val Thr
100 105 110
<210> 39
<211> 114
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 39
Lys Gln Glu Val Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Val Pro Glu Gly
1 5 10 15
Glu Asn Val Ser Ile Asn Cys Ser Phe Thr Asp Ser Ala Ile Tyr Asn
20 25 30
Leu Gln Trp Phe Arg Gln Asp Pro Gly Lys Gly Leu Thr Ser Leu Leu

35 40 45

Leu Ile Gln Ser Ser Gln Arg Glu Gln Thr Ser Gly Arg Leu Asn Ala

50 55 60

Ser Leu Asp Lys Ser Ser Gly Arg Ser Thr Leu Tyr Ile Glu Ser Ser

65 70 75 80

Gln Pro Gly Asp Ser Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Val Arg Pro Thr Ser

85 90 95

Gly Gly Ser Tyr Ile Pro Thr Phe Gly Lys Gly Thr Lys Leu Ser Val

100 105 110

Thr Pro

<210> 40

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 40

Asn Ala Gly Val Thr Gln Thr Pro Lys Tyr Gln Ser Leu Lys Thr Gly

1 5 10 15

[0016]

Gln Ser Val Thr Leu Gln Cys Ala Gln Asp Met Asn His Glu Tyr Met

20 25 30

Ser Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Gln Gly Leu Arg Leu Ile His Tyr

35 40 45

Ser Val Gly Ala Gly Ile Thr Asp Gln Gly Glu Val Pro Asn Gly Tyr

50 55 60

Asn Val Ser Arg Ser Thr Thr Glu Asp Phe Pro Leu Arg Ile Glu Ser

65 70 75 80

Leu Thr Pro Ser Asp Ser Ala Val Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Tyr Val

85 90 95

Gly Asn Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu Thr Val

100 105 110

Thr

<210> 41

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 41

Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly

1 5 10 15

Gly Gly Ser Glu Gly Gly Thr Gly

20

<210> 42

<211> 251

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 42

Lys Gln Glu Val Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Val Pro Glu Gly

1 5 10 15

Glu Asn Val Ser Ile Asn Cys Ser Phe Thr Asp Ser Ala Ile Tyr Asn

20 25 30

Leu Gln Trp Phe Arg Gln Asp Pro Gly Lys Gly Leu Thr Ser Leu Leu

35 40 45

[0017]

Leu Ile Gln Ser Ser Gln Arg Glu Gln Thr Ser Gly Arg Leu Asn Ala

50 55 60

Ser Leu Asp Lys Ser Ser Gly Arg Ser Thr Leu Tyr Ile Glu Ser Ser

65 70 75 80

Gln Pro Gly Asp Ser Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Val Arg Pro Thr Ser

85 90 95

Gly Gly Ser Tyr Ile Pro Thr Phe Gly Lys Gly Thr Lys Leu Ser Val

100 105 110

Thr Pro Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser

115 120 125

Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Thr Gly Asn Ala Gly Val Thr Gln

130 135 140

Thr Pro Lys Tyr Gln Ser Leu Lys Thr Gly Gln Ser Val Thr Leu Gln

145 150 155 160

Cys Ala Gln Asp Met Asn His Glu Tyr Met Ser Trp Tyr Arg Gln Asp

165 170 175

Pro Gly Gln Gly Leu Arg Leu Ile His Tyr Ser Val Gly Ala Gly Ile

180 185 190

Thr Asp Gln Gly Glu Val Pro Asn Gly Tyr Asn Val Ser Arg Ser Thr

195 200 205

Thr Glu Asp Phe Pro Leu Arg Ile Glu Ser Leu Thr Pro Ser Asp Ser

210 215 220

Ala Val Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Tyr Val Gly Asn Thr Gly Glu Leu

225 230 235 240

Phe Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu Thr Val Thr

245 250

<210> 43

<211> 41

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> misc_feature

<222> (22)..(22)

<223> n is a, c, g 或 t

<400> 43

[0018]

ccggccatgg ccaagcagga antkacgcaa tccccgtcgt c 41

<210> 44

<211> 41

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 44

aatccccgtc gtcavdgtct vdgccggaag gcgaaaatgt c 41

<210> 45

<211> 38

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> misc_feature

<222> (22)..(22)

<223> n is a, c, g 或 t

<400> 45

tcgctggatc acccggtgm antgattcaa tatacagg 38

<210> 46
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 46
cagccgggtg actccgcgac gtactttgt g 31
<210> 47
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> misc_feature
<222> (17)..(17)
<223> n is a, c, g 或 t
<400> 47
ttcggcgttt gggmanacc cgcattac 28
[0019] <210> 48
<211> 41
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 48
accxaaacgc cgaatacvd gagcvdgaag acgggtcagt c 41
<210> 49
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(20)
<223> n is a, c, g 或 t
<400> 49
gcggagtcac tcgggtman tgattcaatg c 31
<210> 50

<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 50
accceagtg actccgcadb gtatctgtgt gcttcg 36
<210> 51
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 51
tcgagtgcgg ccgccgtcac cgta 25
<210> 52
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 52
[0020] agccggccat ggccaagcag gaagtcac 28
<210> 53
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 53
gattgagaca tttcmmytt ccgggacag 29
<210> 54
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 54
gtcactgtct gtcccggaar rkgaaaatgt ctcaatc 37
<210> 55
<211> 38
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 55
cacaaaagta cgtcgcmyyg tcmmycggct gcgatgat 38
<210> 56
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 56
cgacgtactt ttgtgcggtt cgtcc 25
<210> 57
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 57
cagcttcgta cccttgccga aggtc 25
<210> 58
<211> 32
<212> DNA
[0021] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 58
ttcggcaagg gtacgaagct grrkgtcag cc 32
<210> 59
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 59
cattgcaggg tcacmyyctg myycgtmyyc aggctctggt 40
<210> 60
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 60
gtgaccctgc aatgcgccca ggatgatg 27
<210> 61
<211> 32

<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 61
cacagataaa ctgcggagtc myycggggtc ag 32
<210> 62
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 62
gactccgcag ttatctgtg tgcttcgtcc 30
<210> 63
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 63
gagtgcggcc gccgtcacmy ycaggcgcgt g 31
[0022] <210> 64
<211> 41
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 64
ccggccatgg ccaagcagga agtcacgcaa tccccgtcgt c 41
<210> 65
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 65
acgcaatccc cgtcgtcact grrkgctccg gaagg 35
<210> 66
<211> 38
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>

<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> n is a, c, g 或 t
<400> 66
ggagtcaccc ggctgmanmy yttcaatata cagggtac 38
<210> 67
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 67
cagccgggtg actccrrkac gtacttttgt gcg 33
<210> 68
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 68
[0023] ttcgctgccg cccccmyycg tgacgctcag ctt 33
<210> 69
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 69
aagctgagcg tcacgrrkgg gggcggcagc 30
<210> 70
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 70
gcattgcagg gtcacagact gaccmyyctt caggctc 37
<210> 71
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 71
 gtcagtctgt gaccctgcaa tgcgccagg atatg 35
 <210> 72
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <400> 72
 ctgaggagtc actcggmyyc agmyyttcaa tgcg 34
 <210> 73
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <400> 73
 ccgagtgact ccgagttta tctgtgtget tcgtcc 36
 <210> 74
 <211> 23
 <212> DNA
 [0024] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <400> 74
 agtgcggccg cmyycaccgt cag 23
 <210> 75
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <400> 75
 Lys Gln Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Asn Arg Pro Glu Ser
 1 5 10 15
 Glu Asn Val Ser Ile Asn Cys Ser Phe Thr Asp Ser Ala Ile Tyr Asn
 20 25 30
 Leu Gln Trp Phe Arg Gln Asp Pro Gly Lys Gly Leu Thr Ser Leu Leu
 35 40 45
 Leu Ile Gln Ser Ser Gln Arg Glu Gln Thr Ser Gly Arg Leu Asn Ala
 50 55 60
 Ser Leu Asp Lys Ser Ser Gly Arg Ser Thr Leu Tyr Ile Glu Asn Val

65 70 75 80

Gln Pro Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Phe Cys Ser Val Arg Pro Thr Ser

85 90 95

Gly Gly Ser Tyr Ile Pro Thr Phe Gly Lys Gly Thr Lys Leu Ser Val

100 105 110

Thr Asn

<210> 76

<211> 114

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 76

Lys Gln Glu Val Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Asn Val Pro Glu Ser

1 5 10 15

Glu Asn Val Ser Ile Asn Cys Ser Phe Thr Asp Ser Ala Ile Tyr Asn

20 25 30

Leu Gln Trp Phe Arg Gln Asp Pro Gly Lys Gly Leu Thr Ser Leu Leu

35 40 45

[0025]

Leu Ile Gln Ser Ser Gln Arg Glu Gln Thr Ser Gly Arg Leu Asn Ala

50 55 60

Ser Leu Asp Lys Ser Ser Gly Arg Ser Thr Leu Tyr Ile Glu Asn Val

65 70 75 80

Gln Pro Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Phe Cys Ala Val Arg Pro Thr Ser

85 90 95

Gly Gly Ser Tyr Ile Pro Thr Phe Gly Lys Gly Thr Lys Leu Ser Val

100 105 110

Thr Asn

<210> 77

<211> 114

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 77

Lys Gln Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Glu Asn Val Pro Glu Ser

1 5 10 15

Glu Asn Val Ser Ile Asn Cys Ser Phe Thr Asp Ser Ala Ile Tyr Asn

20 25 30

Leu Gln Trp Phe Arg Gln Asp Pro Gly Lys Gly Leu Thr Ser Leu Leu

35 40 45

Leu Ile Gln Ser Ser Gln Arg Glu Gln Thr Ser Gly Arg Leu Asn Ala

50 55 60

Ser Leu Asp Lys Ser Ser Gly Arg Ser Thr Leu Tyr Ile Glu Asn Val

65 70 75 80

Gln Pro Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Phe Cys Ser Val Arg Pro Thr Ser

85 90 95

Gly Gly Ser Tyr Ile Pro Thr Phe Gly Lys Gly Thr Lys Leu Ser Val

100 105 110

Thr Asn

<210> 78

<211> 114

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 78

[0026]

Lys Gln Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Asn Val Pro Glu Ser

1 5 10 15

Glu Asn Val Ser Ile Asn Cys Ser Phe Thr Asp Ser Ala Ile Tyr Asn

20 25 30

Leu Gln Trp Phe Arg Gln Asp Pro Gly Lys Gly Leu Thr Ser Leu Leu

35 40 45

Leu Ile Gln Ser Ser Gln Arg Glu Gln Thr Ser Gly Arg Leu Asn Ala

50 55 60

Ser Leu Asp Lys Ser Ser Gly Arg Ser Thr Leu Tyr Ile Glu Asn Val

65 70 75 80

Gln Pro Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Phe Cys Ser Val Arg Pro Thr Ser

85 90 95

Gly Gly Ser Tyr Ile Pro Thr Phe Gly Lys Gly Thr Lys Leu Ser Val

100 105 110

Thr Asn

<210> 79

<211> 114

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 79

Lys Gln Glu Val Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Asn Lys Pro Glu Ser
1 5 10 15

Glu Asn Val Ser Ile Asn Cys Ser Phe Thr Asp Ser Ala Ile Tyr Asn
20 25 30

Leu Gln Trp Phe Arg Gln Asp Pro Gly Lys Gly Leu Thr Ser Leu Leu
35 40 45

Leu Ile Gln Ser Ser Gln Arg Glu Gln Thr Ser Gly Arg Leu Asn Ala
50 55 60

Ser Leu Asp Lys Ser Ser Gly Arg Ser Thr Leu Tyr Ile Glu Asn Val
65 70 75 80

Gln Pro Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Phe Cys Ser Val Arg Pro Thr Ser
85 90 95

Gly Gly Ser Tyr Ile Pro Thr Phe Gly Lys Gly Thr Lys Leu Ser Val
100 105 110

[0027]

Thr Asn

<210> 80

<211> 114

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 80

Lys Gln Glu Val Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser Val Pro Glu Ser
1 5 10 15

Glu Asn Val Ser Ile Asn Cys Ser Phe Thr Asp Ser Ala Ile Tyr Asn
20 25 30

Leu Gln Trp Phe Arg Gln Asp Pro Gly Lys Gly Leu Thr Ser Leu Leu
35 40 45

Leu Ile Gln Ser Ser Gln Arg Glu Gln Thr Ser Gly Arg Leu Asn Ala
50 55 60

Ser Leu Asp Lys Ser Ser Gly Arg Ser Thr Leu Tyr Ile Glu Arg Ile
65 70 75 80

Gln Pro Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Phe Cys Ala Val Arg Pro Thr Ser

85 90 95
Gly Gly Ser Tyr Ile Pro Thr Phe Gly Lys Gly Thr Lys Leu Ser Val
100 105 110
Thr Asn
<210> 81
<211> 114
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 81
Lys Gln Glu Val Thr Gln Ser Pro Ser Ser Glu Ser Val Pro Glu Ser
1 5 10 15
Glu Asn Val Ser Ile Asn Cys Ser Phe Thr Asp Ser Ala Ile Tyr Asn
20 25 30
Leu Gln Trp Phe Arg Gln Asp Pro Gly Lys Gly Leu Thr Ser Leu Leu
35 40 45
Leu Ile Gln Ser Ser Gln Arg Glu Gln Thr Ser Gly Arg Leu Asn Ala
50 55 60
[0028] Ser Leu Asp Lys Ser Ser Gly Arg Ser Thr Leu Tyr Ile Glu Arg Ile
65 70 75 80
Gln Pro Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Phe Cys Ala Val Arg Pro Thr Ser
85 90 95
Gly Gly Ser Tyr Ile Pro Thr Phe Gly Lys Gly Thr Lys Leu Ser Val
100 105 110
Thr Asn
<210> 82
<211> 114
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 82
Lys Gln Glu Val Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Val Pro Glu Ser
1 5 10 15
Glu Asn Val Ser Ile Asn Cys Ser Phe Thr Asp Ser Ala Ile Tyr Asn
20 25 30
Leu Gln Trp Phe Arg Gln Asp Pro Gly Lys Gly Leu Thr Ser Leu Leu

35 40 45

Leu Ile Gln Ser Ser Gln Arg Glu Gln Thr Ser Gly Arg Leu Asn Ala

50 55 60

Ser Leu Asp Lys Ser Ser Gly Arg Ser Thr Leu Tyr Ile Glu Arg Ile

65 70 75 80

Gln Pro Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Phe Cys Ala Val Arg Pro Thr Ser

85 90 95

Gly Gly Ser Tyr Ile Pro Thr Phe Gly Lys Gly Thr Lys Leu Ser Val

100 105 110

Thr Asn

<210> 83

<211> 114

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 83

Lys Gln Glu Val Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Lys Pro Glu Ser

1 5 10 15

[0029]

Glu Asn Val Ser Ile Asn Cys Ser Phe Thr Asp Ser Ala Ile Tyr Asn

20 25 30

Leu Gln Trp Phe Arg Gln Asp Pro Gly Lys Gly Leu Thr Ser Leu Leu

35 40 45

Leu Ile Gln Ser Ser Gln Arg Glu Gln Thr Ser Gly Arg Leu Asn Ala

50 55 60

Ser Leu Asp Lys Ser Ser Gly Arg Ser Thr Leu Tyr Ile Glu Arg Ile

65 70 75 80

Gln Pro Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Phe Cys Ala Val Arg Pro Thr Ser

85 90 95

Gly Gly Ser Tyr Ile Pro Thr Phe Gly Lys Gly Thr Lys Leu Ser Val

100 105 110

Thr Asn

<210> 84

<211> 114

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 84

Lys Gln Glu Val Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Asn Val Pro Glu Ser

1 5 10 15

Glu Asn Val Ser Ile Asn Cys Ser Phe Thr Asp Ser Ala Ile Tyr Asn

20 25 30

Leu Gln Trp Phe Arg Gln Asp Pro Gly Lys Gly Leu Thr Ser Leu Leu

35 40 45

Leu Ile Gln Ser Ser Gln Arg Glu Gln Thr Ser Gly Arg Leu Asn Ala

50 55 60

Ser Leu Asp Lys Ser Ser Gly Arg Ser Thr Leu Tyr Ile Glu Asn Val

65 70 75 80

Gln Pro Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Phe Cys Ser Val Arg Pro Thr Ser

85 90 95

Gly Gly Ser Tyr Ile Pro Thr Phe Gly Lys Gly Thr Lys Leu Ser Val

100 105 110

Thr Asn

<210> 85

[0030]

<211> 114

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 85

Lys Gln Glu Val Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Val Pro Glu Ser

1 5 10 15

Glu Asn Val Ser Ile Asn Cys Ser Phe Thr Asp Ser Ala Ile Tyr Asn

20 25 30

Leu Gln Trp Phe Arg Gln Asp Pro Gly Lys Gly Leu Thr Ser Leu Leu

35 40 45

Leu Ile Gln Ser Ser Gln Arg Glu Gln Thr Ser Gly Arg Leu Asn Ala

50 55 60

Ser Leu Asp Lys Ser Ser Gly Arg Ser Thr Leu Tyr Ile Glu Arg Ile

65 70 75 80

Gln Pro Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Phe Cys Ala Val Arg Pro Thr Ser

85 90 95

Gly Gly Ser Tyr Ile Pro Thr Phe Gly Lys Gly Thr Lys Leu Ser Val

100 105 110
Thr Asn
<210> 86
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 86
Asn Ala Gly Ile Thr Gln Thr Pro Lys Tyr Leu Ser Val Lys Thr Gly
1 5 10 15
Gln Ser Val Thr Leu Gln Cys Ala Gln Asp Met Asn His Glu Tyr Met
20 25 30
Ser Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Gln Gly Leu Arg Leu Ile His Tyr
35 40 45
Ser Val Gly Ala Gly Ile Thr Asp Gln Gly Glu Val Pro Asn Gly Tyr
50 55 60
Asn Val Ser Arg Ser Thr Thr Glu Asp Phe Pro Leu Arg Ile Glu Ser
65 70 75 80
[0031] Val Thr Pro Ser Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Tyr Val
85 90 95
Gly Asn Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu Glu Val
100 105 110
Asp
<210> 87
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 87
Asn Ala Gly Ile Thr Gln Thr Pro Lys Tyr Leu Ser Val Lys Thr Gly
1 5 10 15
Gln Ser Val Thr Leu Gln Cys Ala Gln Asp Met Asn His Glu Tyr Met
20 25 30
Ser Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Gln Gly Leu Arg Leu Ile His Tyr
35 40 45
Ser Val Gly Ala Gly Ile Thr Asp Gln Gly Glu Val Pro Asn Gly Tyr

50 55 60

Asn Val Ser Arg Ser Thr Thr Glu Asp Phe Pro Leu Arg Ile Glu Ser

65 70 75 80

Val Thr Pro Ser Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Tyr Val

85 90 95

Gly Asn Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu Glu Val

100 105 110

Asp

<210> 88

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 88

Asn Ala Gly Val Thr Gln Thr Pro Lys Tyr Leu Ser Val Lys Thr Gly

1 5 10 15

Gln Ser Val Thr Leu Gln Cys Ala Gln Asp Met Asn His Glu Tyr Met

20 25 30

[0032]

Ser Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Gln Gly Leu Arg Leu Ile His Tyr

35 40 45

Ser Val Gly Ala Gly Ile Thr Asp Gln Gly Glu Val Pro Asn Gly Tyr

50 55 60

Asn Val Ser Arg Ser Thr Thr Glu Asp Phe Pro Leu Arg Ile Glu Ser

65 70 75 80

Val Thr Pro Ser Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Tyr Val

85 90 95

Gly Asn Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu Glu Val

100 105 110

Asp

<210> 89

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 89

Asn Ala Gly Val Thr Gln Thr Pro Lys Tyr Leu Ser Val Lys Thr Gly

1 5 10 15

Gln Ser Val Thr Leu Gln Cys Ala Gln Asp Met Asn His Glu Tyr Met

20 25 30

Ser Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Gln Gly Leu Arg Leu Ile His Tyr

35 40 45

Ser Val Gly Ala Gly Ile Thr Asp Gln Gly Glu Val Pro Asn Gly Tyr

50 55 60

Asn Val Ser Arg Ser Thr Thr Glu Asp Phe Pro Leu Arg Ile Glu Ser

65 70 75 80

Val Thr Pro Ser Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Tyr Val

85 90 95

Gly Asn Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu Glu Val

100 105 110

Asp

<210> 90

<211> 113

<212> PRT

[0033]

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 90

Asn Ala Gly Ile Thr Gln Thr Pro Lys Tyr Leu Ser Val Lys Thr Gly

1 5 10 15

Gln Ser Val Thr Leu Gln Cys Ala Gln Asp Met Asn His Glu Tyr Met

20 25 30

Ser Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Gln Gly Leu Arg Leu Ile His Tyr

35 40 45

Ser Val Gly Ala Gly Ile Thr Asp Gln Gly Glu Val Pro Asn Gly Tyr

50 55 60

Asn Val Ser Arg Ser Thr Thr Glu Asp Phe Pro Leu Arg Ile Glu Ser

65 70 75 80

Val Thr Pro Ser Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Tyr Val

85 90 95

Gly Asn Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu Glu Val

100 105 110

Asp

<210> 91

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 91

Asn Ala Gly Ile Thr Gln Thr Pro Lys Tyr Val Ser Val Lys Thr Gly

1 5 10 15

Gln Ser Val Thr Leu Gln Cys Ala Gln Asp Met Asn His Glu Tyr Met

20 25 30

Ser Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Gln Gly Leu Arg Leu Ile His Tyr

35 40 45

Ser Val Gly Ala Gly Ile Thr Asp Gln Gly Glu Val Pro Asn Gly Tyr

50 55 60

Asn Val Ser Arg Ser Thr Thr Glu Asp Phe Pro Leu Arg Ile Glu Ser

65 70 75 80

Val Thr Pro Ser Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Tyr Val

85 90 95

[0034]

Gly Asn Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu Glu Val

100 105 110

Asp

<210> 92

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 92

Asn Ala Gly Val Thr Gln Thr Pro Lys Tyr Val Ser Val Lys Thr Gly

1 5 10 15

Gln Ser Val Thr Leu Gln Cys Ala Gln Asp Met Asn His Glu Tyr Met

20 25 30

Ser Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Gln Gly Leu Arg Leu Ile His Tyr

35 40 45

Ser Val Gly Ala Gly Ile Thr Asp Gln Gly Glu Val Pro Asn Gly Tyr

50 55 60

Asn Val Ser Arg Ser Thr Thr Glu Asp Phe Pro Leu Arg Ile Glu Ser

65 70 75 80

Val Thr Pro Ser Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Tyr Val

85 90 95

Gly Asn Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu Glu Val

100 105 110

Asp

<210> 93

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 93

Asn Ala Gly Val Thr Gln Thr Pro Lys Tyr Val Ser Val Lys Thr Gly

1 5 10 15

Gln Ser Val Thr Leu Gln Cys Ala Gln Asp Met Asn His Glu Tyr Met

20 25 30

Ser Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Gln Gly Leu Arg Leu Ile His Tyr

35 40 45

[0035]

Ser Val Gly Ala Gly Ile Thr Asp Gln Gly Glu Val Pro Asn Gly Tyr

50 55 60

Asn Val Ser Arg Ser Thr Thr Glu Asp Phe Pro Leu Arg Ile Glu Ser

65 70 75 80

Val Thr Pro Ser Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Tyr Val

85 90 95

Gly Asn Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu Glu Val

100 105 110

Asp

<210> 94

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 94

Asn Ala Gly Ile Thr Gln Thr Pro Lys Tyr Val Ser Val Lys Thr Gly

1 5 10 15

Gln Ser Val Thr Leu Gln Cys Ala Gln Asp Met Asn His Glu Tyr Met

20 25 30

Ser Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Gln Gly Leu Arg Leu Ile His Tyr

35 40 45

Ser Val Gly Ala Gly Ile Thr Asp Gln Gly Glu Val Pro Asn Gly Tyr

50 55 60

Asn Val Ser Arg Ser Thr Thr Glu Asp Phe Pro Leu Arg Ile Glu Ser

65 70 75 80

Val Thr Pro Ser Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Tyr Val

85 90 95

Gly Asn Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu Glu Val

100 105 110

Asp

<210> 95

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 95

[0036]

Asn Ala Gly Ile Thr Gln Thr Pro Lys Tyr Leu Ser Val Lys Thr Gly

1 5 10 15

Gln Ser Val Thr Leu Gln Cys Ala Gln Asp Met Asn His Glu Tyr Met

20 25 30

Ser Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Gln Gly Leu Arg Leu Ile His Tyr

35 40 45

Ser Val Gly Ala Gly Ile Thr Asp Gln Gly Glu Val Pro Asn Gly Tyr

50 55 60

Asn Val Ser Arg Ser Thr Thr Glu Asp Phe Pro Leu Arg Ile Glu Ser

65 70 75 80

Val Thr Pro Ser Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Tyr Val

85 90 95

Gly Asn Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu Glu Val

100 105 110

Asp

<210> 96

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 96

Asn Ala Gly Ile Thr Gln Thr Pro Lys Tyr Val Ser Val Lys Thr Gly

1 5 10 15

Gln Ser Val Thr Leu Gln Cys Ala Gln Asp Met Asn His Glu Tyr Met

20 25 30

Ser Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Gln Gly Leu Arg Leu Ile His Tyr

35 40 45

Ser Val Gly Ala Gly Ile Thr Asp Gln Gly Glu Val Pro Asn Gly Tyr

50 55 60

Asn Val Ser Arg Ser Thr Thr Glu Asp Phe Pro Leu Arg Ile Glu Ser

65 70 75 80

Val Thr Pro Ser Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Tyr Val

85 90 95

Gly Asn Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu Glu Val

100 105 110

[0037]

Asp

<210> 97

<211> 114

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 97

Lys Gln Glu Val Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Asn Val Pro Glu Ser

1 5 10 15

Glu Asn Val Ser Ile Asn Cys Ser Phe Thr Asp Ser Ala Ile Tyr Asn

20 25 30

Leu Gln Trp Phe Arg Gln Asp Pro Gly Lys Gly Leu Thr Ser Leu Leu

35 40 45

Leu Ile Gln Ser Ser Gln Arg Glu Gln Thr Ser Gly Arg Leu Asn Ala

50 55 60

Ser Leu Asp Lys Ser Ser Gly Arg Ser Thr Leu Tyr Ile Glu Arg Ile

65 70 75 80

Gln Pro Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Phe Cys Ala Val Arg Pro Thr Ser

85 90 95
Gly Gly Ser Tyr Ile Pro Thr Phe Gly Lys Gly Thr Lys Leu Ser Val
100 105 110
Thr Asn
<210> 98
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 98
Asn Ala Gly Ile Thr Gln Thr Pro Lys Tyr Leu Ser Val Lys Thr Gly
1 5 10 15
Gln Ser Val Thr Leu Gln Cys Ala Gln Asp Met Asn His Glu Tyr Met
20 25 30
Ser Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Gln Gly Leu Arg Leu Ile His Tyr
35 40 45
Ser Val Gly Ala Gly Ile Thr Asp Gln Gly Glu Val Pro Asn Arg Tyr
50 55 60
[0038] Asn Val Ser Arg Ser Thr Thr Glu Asp Phe Pro Leu Arg Ile Glu Ser
65 70 75 80
Val Thr Pro Ser Asp Ser Ala Val Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Tyr Val
85 90 95
Gly Asn Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu Glu Val
100 105 110
Asp
<210> 99
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 99
Asp Ala Lys Thr Thr Gln Pro Asn Ser Met Ser Val Asn Glu Glu Glu
1 5 10 15
Pro Val Ser Ile Pro Cys Asn His Ser Thr Ile Ser Gly Thr Asp Tyr
20 25 30
Ile His Trp Tyr Arg Gln Leu Pro Ser Gln Gly Pro Glu Tyr Val Ile

35 40 45

His Gly Leu Thr Ser Asn Val Asn Asn Arg Arg Ala Ser Leu Ala Ile

50 55 60

Ala Glu Asp Arg Lys Ser Ser Thr Leu Tyr Ile His Arg Ile Thr Pro

65 70 75 80

Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Phe Cys Ala Val Pro Leu Ala Gly Gly Thr

85 90 95

Ser Tyr Gly Lys Leu Thr Phe Gly Lys Gly Thr Lys Leu Ser Val Thr

100 105 110

Asn

<210> 100

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 100

Gly Ala Gly Ile Ser Gln Ser Pro Arg Tyr Val Ser Val Lys Arg Gly

1 5 10 15

[0039]

Gln Asp Val Thr Leu Arg Cys Asp Pro Ile Ser Gly His Val Ser Leu

20 25 30

Phe Trp Tyr Gln Gln Ala Pro Gly Gln Gly Pro Glu Phe Leu Thr Tyr

35 40 45

Phe Gln Asn Glu Ala Gln Leu Asp Lys Ser Gly Leu Pro Ser Asp Arg

50 55 60

Phe Ser Ala Glu Arg Pro Glu Gly Ser Val Ser Thr Leu Lys Ile Gln

65 70 75 80

Ser Val Thr Pro Ser Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Leu

85 90 95

Gly Gln Ala Tyr Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu Glu Val

100 105 110

Asp

<210> 101

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 101

Asp Ala Lys Val Thr Gln Pro Asn Ser Leu Asn Val Asn Glu Glu Glu

1 5 10 15

Pro Val Ser Ile Pro Cys Asn His Ser Thr Ile Ser Gly Thr Asp Tyr

20 25 30

Ile His Trp Tyr Arg Gln Leu Pro Ser Gln Gly Pro Glu Tyr Val Ile

35 40 45

His Gly Leu Thr Ser Asn Val Asn Asn Gly Arg Leu Ser Leu Ala Ile

50 55 60

Ala Glu Asp Arg Lys Ser Ser Thr Leu Tyr Ile Glu Arg Ile Thr Pro

65 70 75 80

Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Phe Cys Ala Val Pro Leu Ala Gly Gly Thr

85 90 95

Ser Tyr Gly Lys Leu Thr Phe Gly Lys Gly Thr Lys Leu Ser Val Thr

100 105 110

Asn

<210> 102

[0040]

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 102

Gly Ala Gly Ile Ser Gln Ser Pro Arg Tyr Leu Ser Val Lys Thr Gly

1 5 10 15

Gln Asp Val Thr Leu Arg Cys Asp Pro Ile Ser Gly His Val Ser Leu

20 25 30

Phe Trp Tyr Gln Gln Ala Pro Gly Gln Gly Pro Glu Phe Leu Thr Tyr

35 40 45

Phe Gln Asn Glu Ala Gln Leu Asp Lys Ser Gly Leu Pro Ser Asp Arg

50 55 60

Phe Ser Ala Glu Arg Pro Glu Gly Ser Val Ser Thr Leu Lys Ile Gln

65 70 75 80

Ser Val Thr Pro Ser Asp Ser Ala Val Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Leu

85 90 95

Gly Gln Ala Tyr Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu Glu Val

100 105 110
Asp
<210> 103
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 103
Thr Gln Leu Leu Glu Gln Ser Pro Gln Ser Met Ser Val Gln Glu Ser
1 5 10 15
Glu Asn Val Thr Ile Tyr Cys Asn Ser Ser Ser Val Phe Ser Ser Leu
20 25 30
Gln Trp Tyr Arg Gln Glu Pro Gly Glu Gly Pro Thr Leu Leu Val Thr
35 40 45
Val Val Thr Gly Gly Glu Val Lys Lys Leu Lys Arg Leu Thr Phe Gln
50 55 60
Phe Gly Asp Ala Arg Lys Asp Ser Ser Leu His Ile Thr Arg Ile Gln
65 70 75 80
[0041] Pro Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Phe Cys Ala Val Ala Gly Ser Gln Gly
85 90 95
Asn Leu Ile Phe Gly Lys Gly Thr Lys Leu Ser Val Thr Asn
100 105 110
<210> 104
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 104
Asp Gly Gly Ile Thr Gln Ser Pro Lys Tyr Val Ser Val Lys Glu Gly
1 5 10 15
Gln Asn Val Thr Leu Ser Cys Glu Gln Asn Leu Asn His Asp Ala Met
20 25 30
Tyr Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Gln Gly Leu Arg Leu Ile Tyr Tyr
35 40 45
Ser Gln Ile Val Asn Asp Phe Gln Lys Gly Asp Ile Ala Glu Gly Tyr
50 55 60

[0042]

Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys Glu Ser Phe Pro Leu Thr Ile Thr Ser
65 70 75 80

Val Thr Lys Ser Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Ser Arg
85 90 95

Ser Ser Tyr Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu Glu Val Asp
100 105 110

<210> 105

<211> 110

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 105

Thr Gln Leu Val Glu Gln Ser Pro Gln Ser Leu Asn Val Gln Glu Ser
1 5 10 15

Glu Asn Val Thr Ile Tyr Cys Asn Ser Ser Ser Val Phe Ser Ser Leu
20 25 30

Gln Trp Tyr Arg Gln Glu Pro Gly Glu Gly Pro Thr Leu Leu Val Thr
35 40 45

Val Val Thr Gly Gly Glu Val Lys Lys Leu Lys Arg Leu Thr Phe Gln
50 55 60

Phe Gly Asp Ala Arg Lys Asp Ser Ser Leu His Ile Glu Arg Ile Gln
65 70 75 80

Pro Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Phe Cys Ala Val Ala Gly Ser Gln Gly
85 90 95

Asn Leu Ile Phe Gly Lys Gly Thr Lys Leu Ser Val Thr Asn
100 105 110

<210> 106

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 106

Asp Gly Gly Ile Thr Gln Ser Pro Lys Tyr Leu Ser Val Lys Thr Gly
1 5 10 15

Gln Ser Val Thr Leu Ser Cys Glu Gln Asn Leu Asn His Asp Ala Met
20 25 30

Tyr Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Gln Gly Leu Arg Leu Ile Tyr Tyr
35 40 45

Ser Gln Ile Val Asn Asp Phe Gln Lys Gly Asp Ile Ala Glu Arg Tyr
50 55 60

Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys Glu Ser Phe Pro Leu Thr Ile Thr Ser
65 70 75 80

Val Thr Lys Ser Asp Ser Ala Val Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Ser Arg
85 90 95

Ser Ser Tyr Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu Glu Val Asp
100 105 110

<210> 107

<211> 114

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 107

Asp Gln Glu Val Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Asn Val Pro Glu Gly
1 5 10 15

[0043]

Glu Asn Val Ser Ile Asn Cys Ser Phe Thr Asp Ser Ala Ile Tyr Asn
20 25 30

Leu Gln Trp Phe Arg Gln Asp Pro Gly Lys Gly Leu Thr Ser Leu Leu
35 40 45

Leu Val Arg Pro Tyr Gln Arg Glu Gln Thr Ser Gly Arg Leu Asn Ala
50 55 60

Ser Leu Asp Lys Ser Ser Gly Arg Ser Thr Leu Tyr Ile Glu Arg Ile
65 70 75 80

Gln Pro Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Phe Cys Ala Val Arg Pro Gly Gly
85 90 95

Ala Gly Ser Tyr Gln Leu Thr Phe Gly Lys Gly Thr Lys Leu Ser Val
100 105 110

Thr Asp

<210> 108

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 108

Lys Ala Gly Ile Thr Gln Thr Pro Arg Tyr Leu Ser Val Lys Thr Gly

1 5 10 15

Gln Ser Val Thr Leu Ser Cys Ser Pro Ile Ser Gly His Arg Ser Val

20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Gln Phe Leu Phe Glu

35 40 45

[0044] Tyr Phe Ser Glu Thr Gln Arg Asn Lys Gly Asn Phe Pro Gly Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Arg Gln Phe Ser Asn Ser Arg Ser Glu Leu Asn Ile Glu Ser

65 70 75 80

Val Thr Pro Ser Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Pro Asn

85 90 95

Met Ala Asp Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu Glu Val Asp

100 105 110

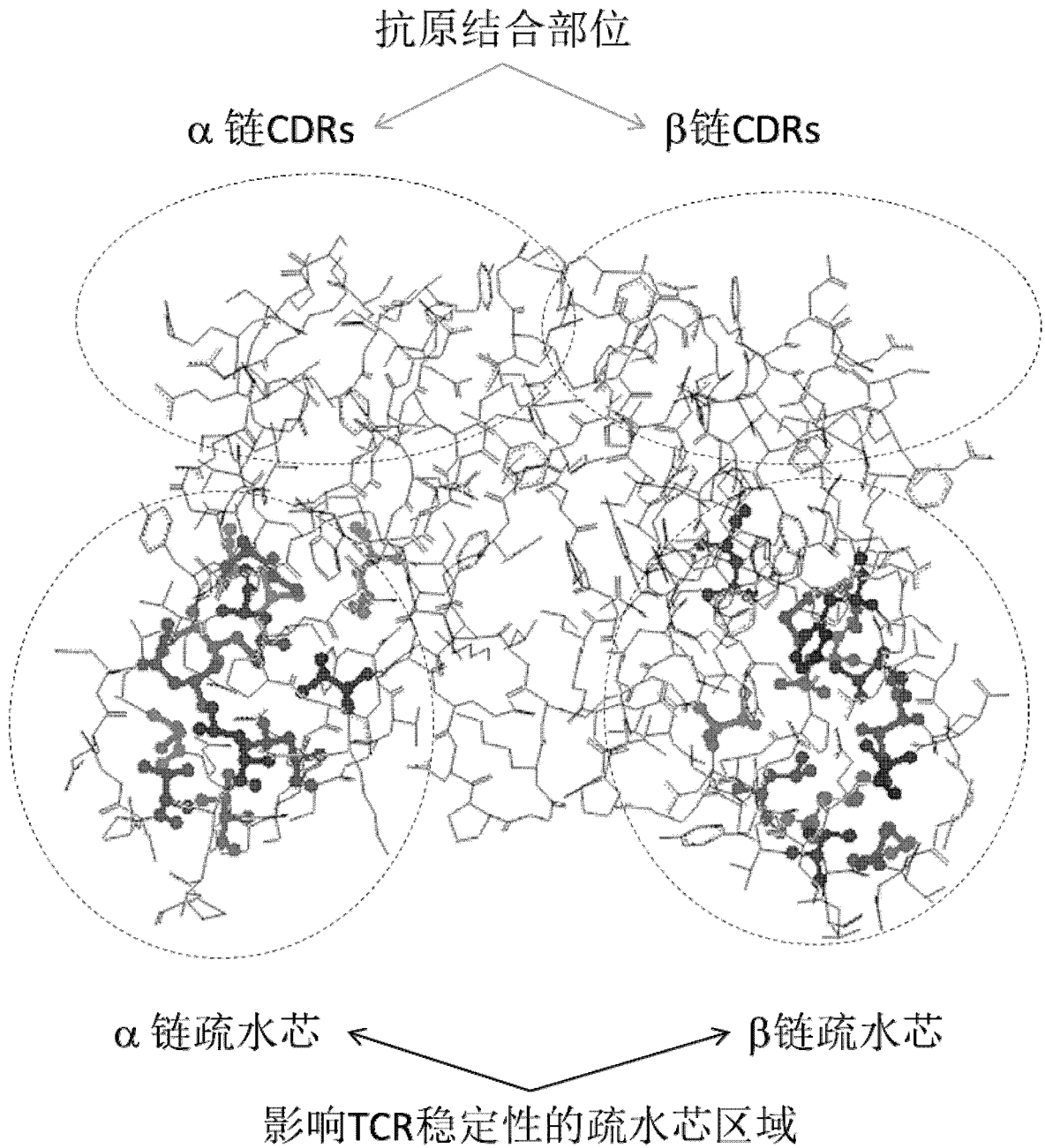


图1

KQEVTSSPSS LSVPEGENLV LNCSTDSAI YNLQWFRQDP GKGLTSLLLV RPYQREQTSG 60
 RLNASLDKSS GRSTLYIESS QPGDSATYLC AVRPGGAGSY QLTFGKGTKL SVTP 114
 (SEQ ID NO: 9)

图2a

```

aaacaggagg tgacgcagtc tccttcatct ctgagtgtcc cagaaggaga aaacttgtct      60
ctcaactgca gtttcaactga tagcgctatt tacaacctcc agtggtttag gcaggacct      120
gggaaaggtc tcacatctct gttgtagtg  cgctccgtatc agagagagca aacaagtgga      180
agacttaatg cctcgtctgga taaatcatca ggacgtagta cttatacat tgaatcttct      240
cagccccggg actcagccac ctacctctgt gctgtgagge cgggaggggc tgggagttac      300
caactcactt tcgggaaggg gaccaaactc tcggtcactc ca                          342
(SEQ ID NO: 10)

```

图2b

```

KAGVTQTPRY LSKTRGQQVT LSCSPISGHR SVSWYQQTPG QGLQFLFEYF SETQRNKGNF      60
PGRFSGRQFS NSRSEMNVT LELGDSALYL CASSPNMADE QYFGPGTRLT VT                112
(SEQ ID NO: 11)

```

图3a

```

aaggctggag tcaactcaaac tccaagatat ctgtccaaaa cgagaggaca gcaagtgaca      60
ctgagctgct ccctatctc  tgggcatagg agtgtatcct ggtaccaaca gaccccagga      120
cagggccttc agttcctctt tgaatacttc agtgagacac agagaaacaa aggaaacttc      180
cctggtegat tctcagggcg ccagttctct aactctcgct ctgagatgaa tgtgagcacc      240
ttggagctgg gggactcggc cttttatctt tgcgccagea gcccgaacat ggccgacgag      300
cagtacttcg ggccggggcac caggctcacg gtcaca                          336
(SEQ ID NO: 12)

```

图3b

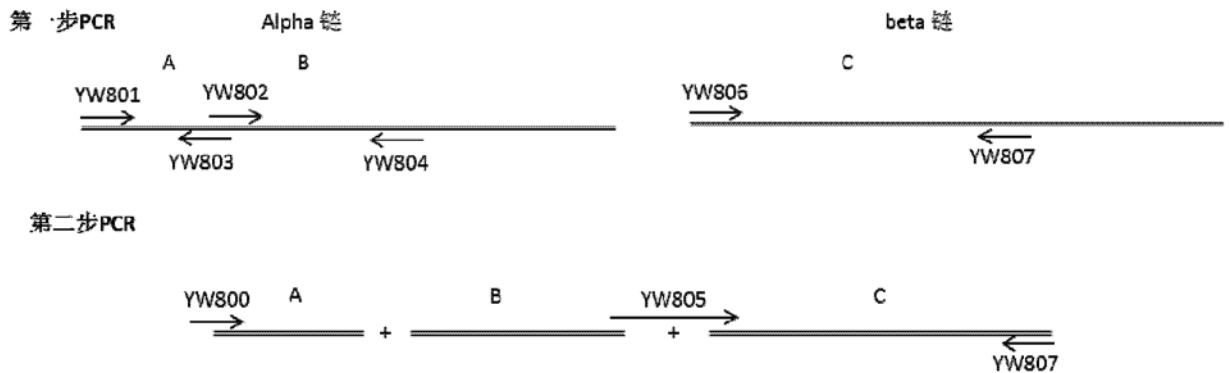


图4

```

GPGGSGGGGE GGGSGGGGE GGSGG      25
(SEQ ID NO: 13)

```

图5a

gggcccgggtg gatctggcgg tggcggtgaa ggcggtggtg gaagcggcgg cggaggcgaa 60
 ggaggctccg gaggc 75
 (SEQ ID NO: 14)

图5b

KQEVTSPPSS LSVPEGENVS INCSTDSAI YNLQWFRQDP GKGLTSLLLV RPYQREQTSG 60
 RLNASLDKSS GRSTLYLESS QPGDSATYLC AVRPPGAGSY QLTFGKGTKL SVTP 114
 (SEQ ID NO: 15)

图6a

KAGVTQTPRY LSKTRGQQVT LSCSPISGHR SVSWYQQTPG QGLQFLFEYF SETQRNKGNF 60
 PGRFSGRQFS NSRSEMNST LELGDSALYL CASSPNMADE QYFGPGRMT VT 112
 (SEQ ID NO: 16)

图6b

KQEVTSPPSS LSVPEGENVS INCSTDSAI YNLQWFRQDP GKGLTSLLLV RPYQREQTSG 60
 RLNASLDKSS GRSTLYIESS QPGDSATYLC AVRPPGAGSY QLTFGKGTKL SVTP 114
 (SEQ ID NO: 17)

图7a

KAGVTQTPRY LSKTRGQQVT LSCSPISGHR SVSWYQQTPG QGLQFLFEYF SETQRNKGNF 60
 PGRFSGRQFS NSRSEMNST LELGDSALYL CASSPNMADE QYFGPGRLT VT 112
 (SEQ ID NO: 18)

图7b

KQEVTSPPSS LSVPEGENVS INCSTDSAI YNLQWFRQDP GKGLTSLLLV RPYQREQTSG 60
 RLNASLDKSS GRSTLYLESS QPGDSATYLC AVRPPGAGSY QLTFGKGTKL SVTP 114
 (SEQ ID NO: 15)

图8a

KAGVTQTPRY LSKTRGQQVT LSCSPISGHR SVSWYQQTPG QGLQFLFEYF SETQRNKGNF 60
 PGRFSGRQFS NSRSEMNI¹ST LELGDSALYL CASSPNMADE QYFGPGTRLT VT 112
 (SEQ ID NO: 18)

图8b

疏水芯优化对比

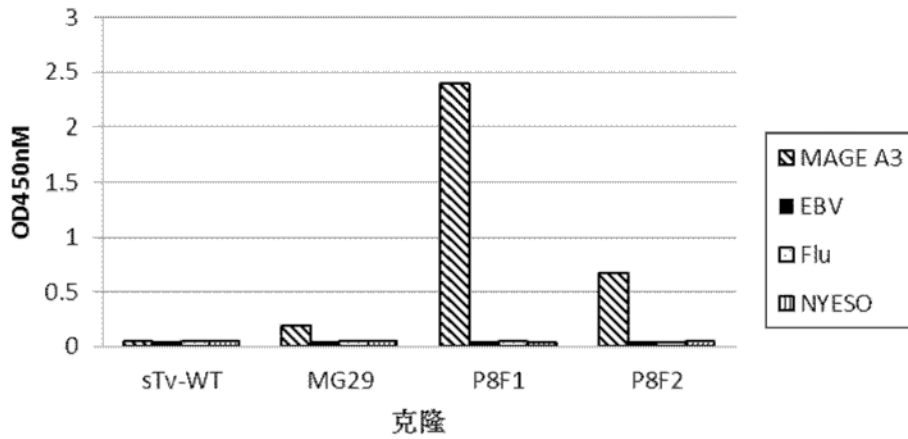


图9

DAKTTQPNSMESNEEEPVHLPCHSTISGTDYIHWRQLPSQGPEYVIHGLTSNVNRMASLAIAEDRKSSTLIL
 HRATLRDAAVYYCILRDAGGTSYGKLTFGQGTILTVHP (SEQ ID NO: 29)

图10a

GAGVSQSPRYKVAKRGQDVALRCDPISGHVSLFWYQQALGQGPEFLTYFQNEAQLDKSGLPSDRFFAERPEGSVS
 TLKIQRTOQEDSAVYLCASSLGQSYEQYFGPGTRLTVT (SEQ ID NO: 30)

图10b

TQLLEQSPQFLSIQEGENLTVYCNSSSVFSSLQWYRQEPGEGPVLLTVVTGGEVKKLKRITFQFGDARKDSSLH
 ITAAQPGDTGLYLCAGGGSQGNLIFGKGTKLSVKP (SEQ ID NO: 31)

图11a

DGGITQSPKYLFRKEGQNVTLSC EQNLNHDAMYWYRQDPGQGLRLIYYSQIVNDFQKGDIAEGYSVSREKKESFPLTVT
SAQKNPTAFYLCASSIRSSYEQYFGPGTRLTVT (SEQ ID NO: 32)

图11b

KQEV TQIPAALSVPEGENLVLNCSFTDSAIYNLQWFRQDPGKGLTSLLLIQSSQREQTSGRNLNASLDKSSGRSTLYIAA
SQPGDSATYLCVRPASGGSYIPTFGRGTSLIVHP (SEQ ID NO: 33)

图12a

NAGVTQTPKFQVLKTGQSM TLQCAQDMNHEYMSWYRQDPGMGLRLIHYSVGAGITDQGEV PNGYNVSRSTTEDFPLRL
SAAPSQTSVYFCASSYVGN TGELFFGEGSRLTVL (SEQ ID NO: 34)

图12b

DAKTTQPNSLEVNEEPVHIPCNHSTISGTDYIHWYRQLPSQGPEYVIHGLTSNVNRMASLAI AEDRKSSTLYI
HRATPRDSATYFCAVPLAGGTSYGKLTFGKGTKLSVTP (SEQ ID NO: 35)

图13a

GAGVSQSPRYKSAKRGQDVT LRCDPISGHVSLFWYQQAPGQGPEFLTYFQNEAQLDKSGLPSDRFSAERPEGSVS
TLKIQRLQPEDSAVYLCASSLGQAYEQYFGPGTRLTVT (SEQ ID NO: 36)

图13b

TQLLEQSPQSLSIQEGENVTIYCNSSSVFSSLQWYRQEPGEGPTLLVTVVTGGEVKKLKR LTFQFGDARKDSSLH
ITSAQPGDSGTYFCAVAGSQGNLIFGKGTKLSVTP (SEQ ID NO: 37)

图14a

DGGITQSPKYLSRKEGQNVTLSC EQNLNHDAMYWYRQDPGQGLRLIYYSQIVNDFQKGDIAEGYSVSREKKESFP
LTITSLQKNDSAVYLCASSRSSYEQYFGPGTRLTVT (SEQ ID NO: 38)

图14b

KQEVTSPPSSLSVPEGENVSINCSTDSAIYNLQWFRQDPGKGLTSLLLIQSSQREQTSGRLNASLDKSS
GRSTLYIESSQPGDSATYFC AVRPTSGGSYIPTFGKGTKLSVTP (SEQ ID NO: 39)

图15a

NAGVTQTPKYQSLKTGQSYTLQCAQDMNHEYMSWYRQDPGQGLRLIHYSVGAGITDQGEVPNGYNVSRSTT
EDFPLRIESLTPSDSAVYLCASSYVGNTGELFFGPGTRLTVT (SEQ ID NO: 40)

图15b

GGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGTG (SEQ ID NO: 41)

图16

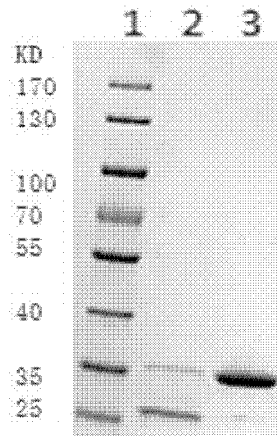


图17

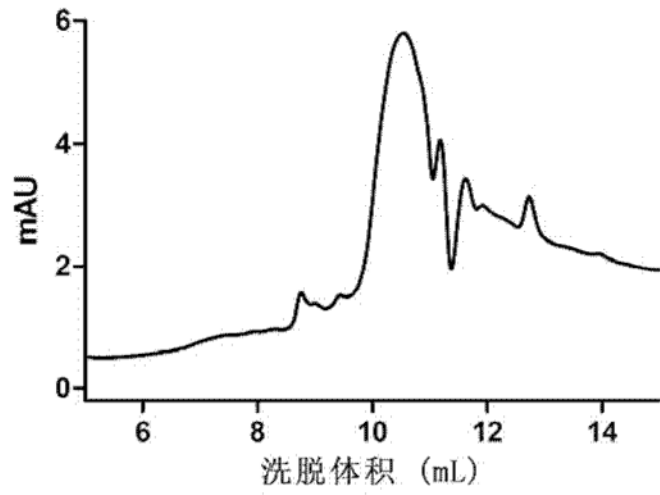


图18a

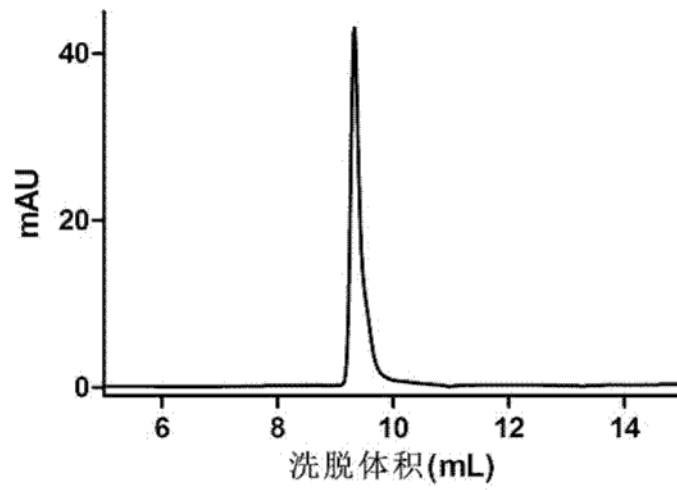


图18b

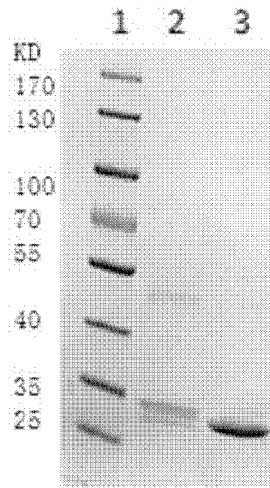


图19

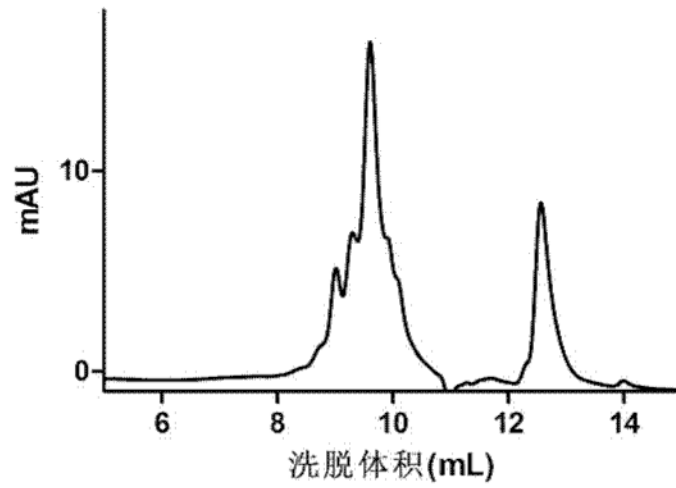


图20a

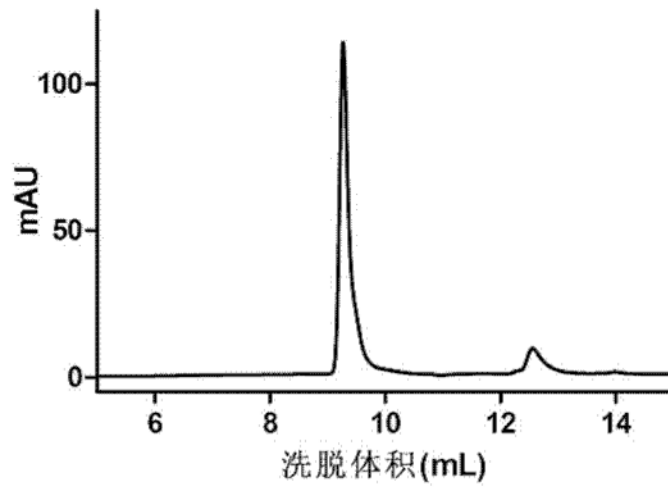


图20b

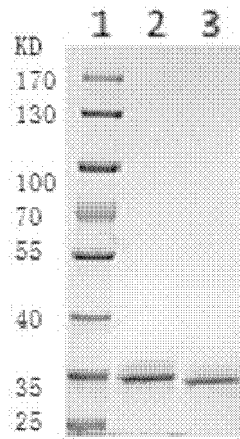


图21

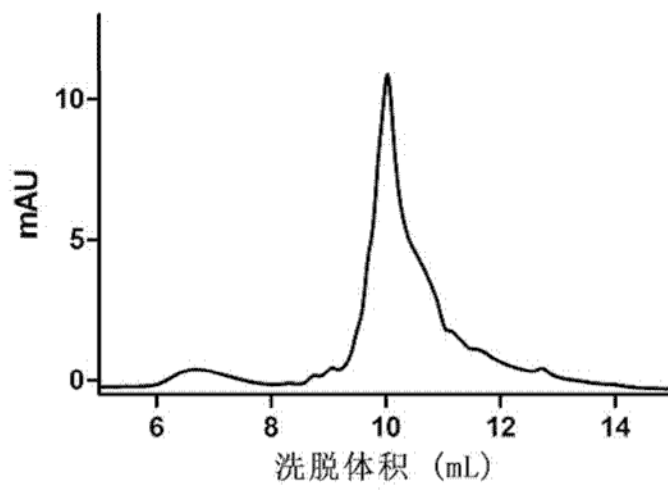


图22a

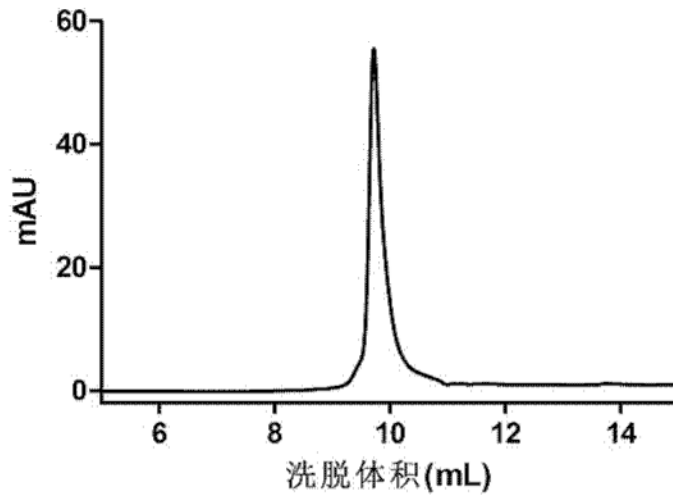


图22b

KQEVTSQSPSSLSVPEGENVSINCSFTDSATYNLQWFRQDPGKGLTSLLLIQSSQREQTSGRNLNASLDKSSGRSTL
 YIESSQP~~GD~~SATYFC~~AVR~~P~~T~~SGGSYIPTFGKGTKLSVTPGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGTGNAGVTQTPKYQS
 LKTGQSVTLQCAQDMNHEYMSWYRQDPGQGLRLIHYSVGAGITDQGEVPNGYNVSRSTTEDFPLRIESLTPSDSA
 VYLCASSYVGNTGELFFGPGTRTLTVT (SEQ ID NO: 42)

图23

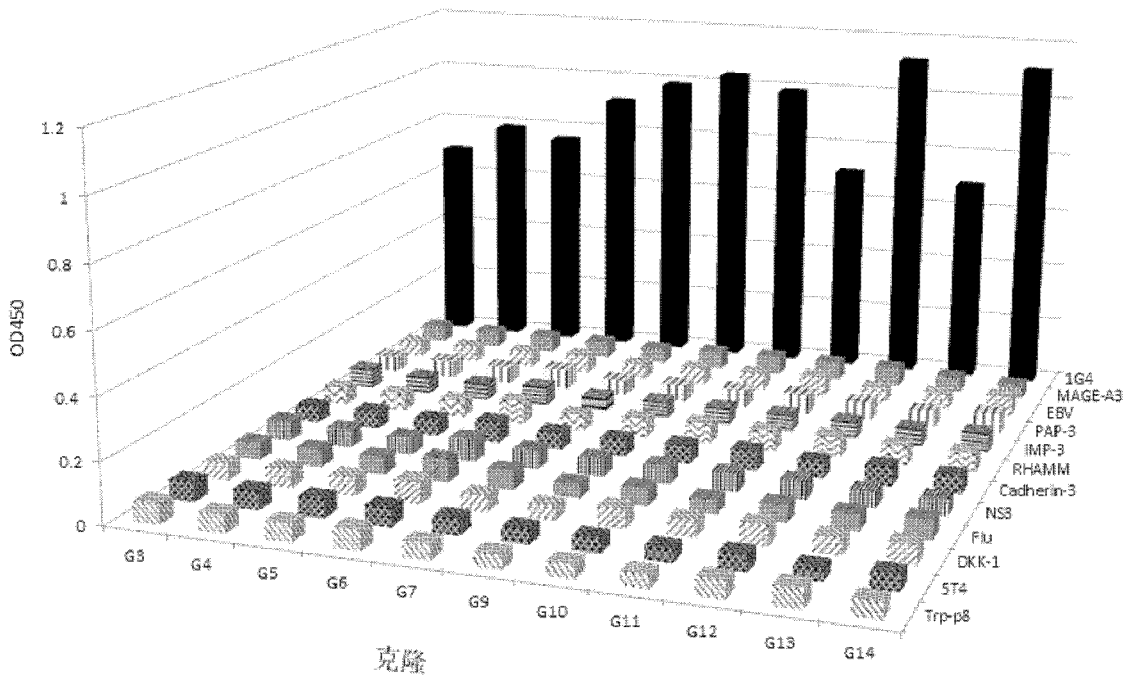


图24

KQELTQSPSSLNRPESENVSINCSFTDSAIYNLQWFRQDPGKGLTSLLLIQSSQREQTS
GRLNASLDKSSGRSTLYIENVQPNDSGTYFCSVRPTSGGSYIPTFGKGTKLSVTN(SEQ
ID NO: 75)

KQEVTQSPSSMNVPESENVSINCSFTDSAIYNLQWFRQDPGKGLTSLLLIQSSQREQTS
GRLNASLDKSSGRSTLYIENVQPNDSGTYFCAVRPTSGGSYIPTFGKGTKLSVTN(SEQ
ID NO: 76)

KQELTQSPSSENVPESENVSINCSFTDSAIYNLQWFRQDPGKGLTSLLLIQSSQREQTSG
RLNASLDKSSGRSTLYIENVQPNDSGTYFCSVRPTSGGSYIPTFGKGTKLSVTN(SEQ ID
NO: 77)

KQELTQSPSSLNVPESENVSINCSFTDSAIYNLQWFRQDPGKGLTSLLLIQSSQREQTSG
RLNASLDKSSGRSTLYIENVQPNDSGTYFCSVRPTSGGSYIPTFGKGTKLSVTN(SEQ ID
NO: 78)

KQEVTQSPSSLNKPESENVSINCSFTDSAIYNLQWFRQDPGKGLTSLLLIQSSQREQTSG
RLNASLDKSSGRSTLYIENVQPNDSGTYFCSVRPTSGGSYIPTFGKGTKLSVTN(SEQ ID
NO: 79)

KQEVTQSPSSMSVPESENVSINCSFTDSAIYNLQWFRQDPGKGLTSLLLIQSSQREQTSG
RLNASLDKSSGRSTLYIERIQPNDSGTYFCAVRPTSGGSYIPTFGKGTKLSVTN(SEQ ID
NO: 80)

KQEVTQSPSSESVPESENVSINCSFTDSAIYNLQWFRQDPGKGLTSLLLIQSSQRE
QTSGRNASLDKSSGRSTLYIERIQPNDSGTYFCAVRPTSGGSYIPTFGKGTKLSVTN(S
EQ ID NO: 81)

KQEVTQSPSSLSVPESENVSINCSFTDSAIYNLQWFRQDPGKGLTSLLLIQSSQRE
QTSGRNASLDKSSGRSTLYIERIQPNDSGTYFCAVRPTSGGSYIPTFGKGTKLSVTN(S
EQ ID NO: 82)

KQEVTQSPSSLSKPESENVSINCSFTDSAIYNLQWFRQDPGKGLTSLLLIQSSQREQTSG
RLNASLDKSSGRSTLYIERIQPNDSGTYFCAVRPTSGGSYIPTFGKGTKLSVTN(SEQ ID
NO: 83)

KQEVTQSPSSLNVPESENVSINCSFTDSAIYNLQWFRQDPGKGLTSLLLIQSSQREQTSG
RLNASLDKSSGRSTLYIENVQPNDSGTYFCSVRPTSGGSYIPTFGKGTKLSVTN(SEQ ID
NO: 84)

KQEVTQSPSSLSVPESENVSINCSFTDSAIYNLQWFRQDPGKGLTSLLLIQSSQREQTSG
RLNASLDKSSGRSTLYIERIQPNDSGTYFCAVRPTSGGSYIPTFGKGTKLSVTN(SEQ ID
NO: 85)

图25

NAGITQTPKYLSVKTGQSVTLQCAQDMNHEYMSWYRQDPGQGLRLIHYSVGAGITDQ
GEVPNGYNVSRSTTEDFPLRIESVTPSDSALYLCASSYVGNTGELFFGPGTRLEVD(SEQ
ID NO: 86)

NAGITQTPKYLSVKTGQSVTLQCAQDMNHEYMSWYRQDPGQGLRLIHYSVGAGITDQ
GEVPNGYNVSRSTTEDFPLRIESVTPSDSALYLCASSYVGNTGELFFGPGTRLEVD(SEQ
ID NO: 87)

NAGVTQTPKYLSVKTGQSVTLQCAQDMNHEYMSWYRQDPGQGLRLIHYSVGAGITD
QGEVPNGYNVSRSTTEDFPLRIESVTPSDSALYLCASSYVGNTGELFFGPGTRLEVD(SE
Q ID NO: 88)

NAGVTQTPKYLSVKTGQSVTLQCAQDMNHEYMSWYRQDPGQGLRLIHYSVGAGITD
QGEVPNGYNVSRSTTEDFPLRIESVTPSDSALYLCASSYVGNTGELFFGPGTRLEVD(SE
Q ID NO: 89)

NAGITQTPKYLSVKTGQSVTLQCAQDMNHEYMSWYRQDPGQGLRLIHYSVGAGITDQ
GEVPNGYNVSRSTTEDFPLRIESVTPSDSALYLCASSYVGNTGELFFGPGTRLEVD(SEQ
ID NO: 90)

NAGITQTPKYVSVKTGQSVTLQCAQDMNHEYMSWYRQDPGQGLRLIHYSVGAGITD
QGEVPNGYNVSRSTTEDFPLRIESVTPSDSALYLCASSYVGNTGELFFGPGTRLEVD(SE
Q ID NO: 91)

NAGVTQTPKYVSVKTGQSVTLQCAQDMNHEYMSWYRQDPGQGLRLIHYSVGAGITD
QGEVPNGYNVSRSTTEDFPLRIESVTPSDSALYLCASSYVGNTGELFFGPGTRLEVD(SE
Q ID NO: 92)

NAGVTQTPKYVSVKTGQSVTLQCAQDMNHEYMSWYRQDPGQGLRLIHYSVGAGITD
QGEVPNGYNVSRSTTEDFPLRIESVTPSDSALYLCASSYVGNTGELFFGPGTRLEVD(SE
Q ID NO: 93)

NAGITQTPKYVSVKTGQSVTLQCAQDMNHEYMSWYRQDPGQGLRLIHYSVGAGITD
QGEVPNGYNVSRSTTEDFPLRIESVTPSDSALYLCASSYVGNTGELFFGPGTRLEVD(SE
Q ID NO: 94)

NAGITQTPKYLSVKTGQSVTLQCAQDMNHEYMSWYRQDPGQGLRLIHYSVGAGITDQ
GEVPNGYNVSRSTTEDFPLRIESVTPSDSALYLCASSYVGNTGELFFGPGTRLEVD(SEQ
ID NO: 95)

NAGITQTPKYVSVKTGQSVTLQCAQDMNHEYMSWYRQDPGQGLRLIHYSVGAGITD
QGEVPNGYNVSRSTTEDFPLRIESVTPSDSALYLCASSYVGNTGELFFGPGTRLEVD(SE
Q ID NO: 96)

图26

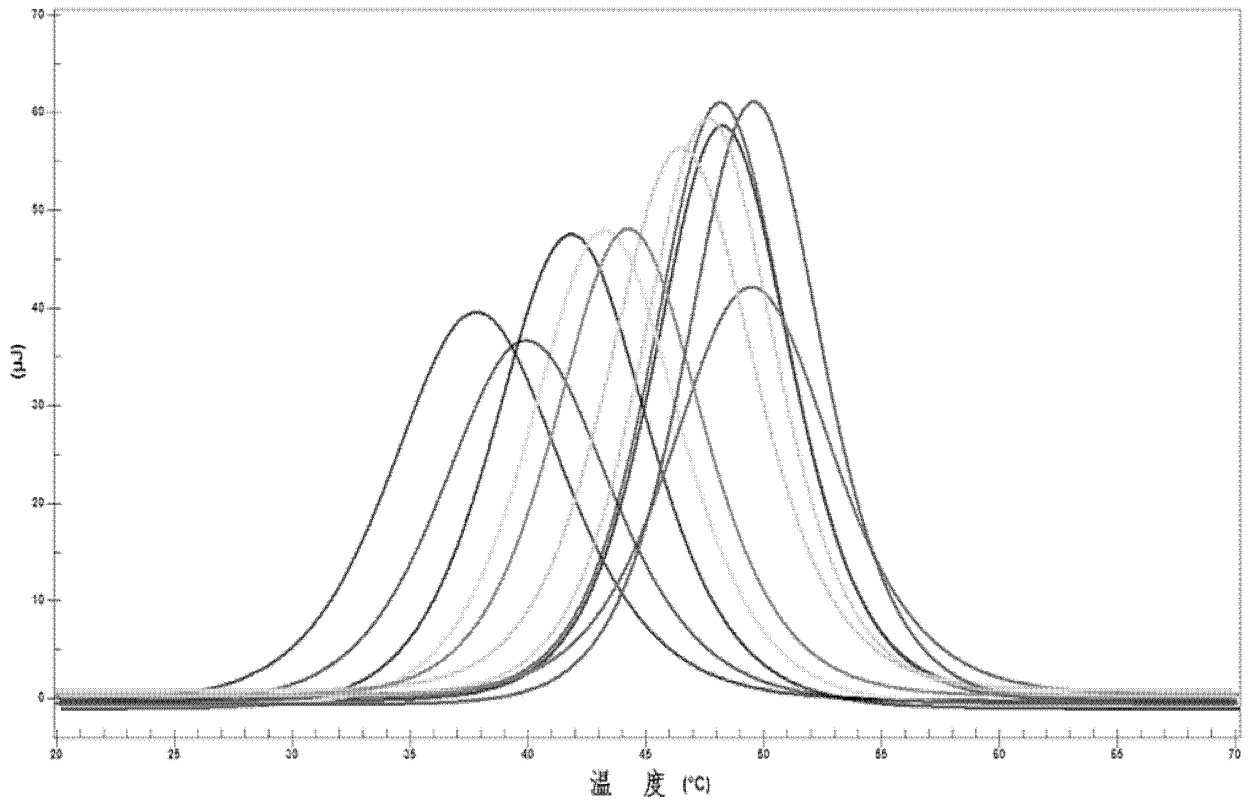


图27

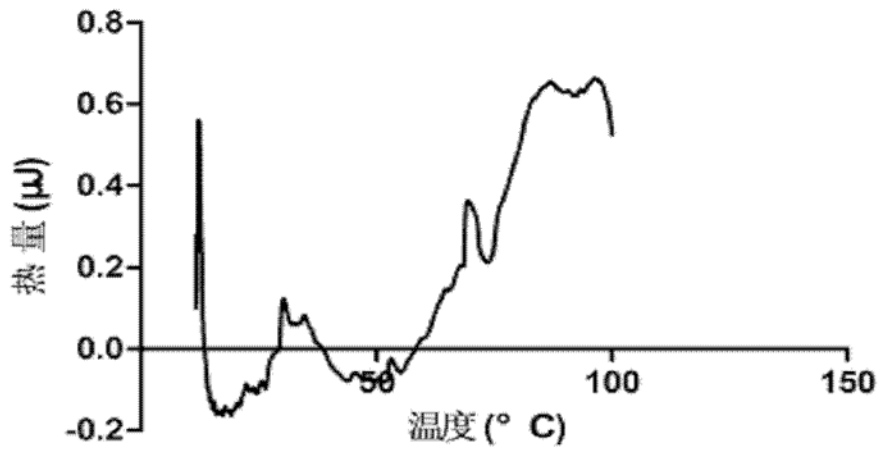


图28

KQEV TQSPSSLNVPESENV SINC SFTDS AIYNLQWFRQDPGKGLTSLLLIQSSQRE
QTSGRLNASLDKSSGRSTLYIERIQPNDSGTYFCAVRPTSGGSYIPTFGKGTKLS
VTN (SEQ ID NO: 97)

图29a

NAGITQTPKYLSVKTGQSVTLQCAQDMNHEYMSWYRQDPGQGLRLIHYSVGA
GITDQGEVPNRYNVSRTTEDFPLRIESVTPSDSAVYLCASSYVGNTGELFFGPG
TRLEVD(SEQ ID NO: 98)

图29b

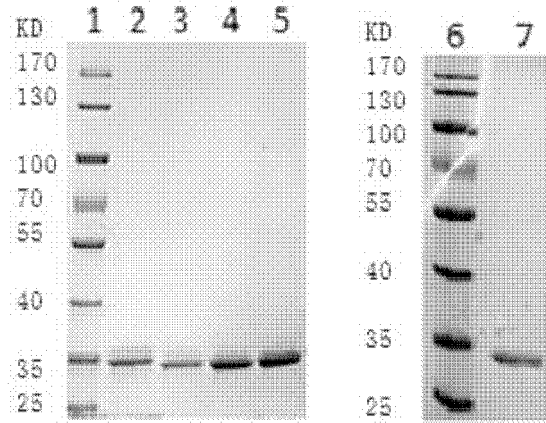


图30

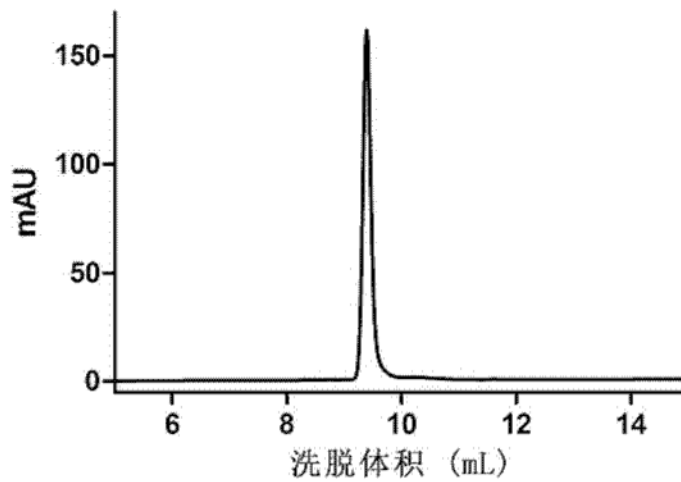


图31a

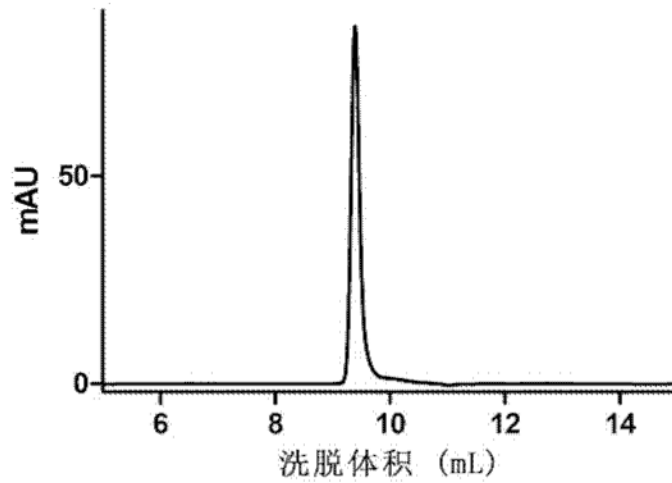


图31b

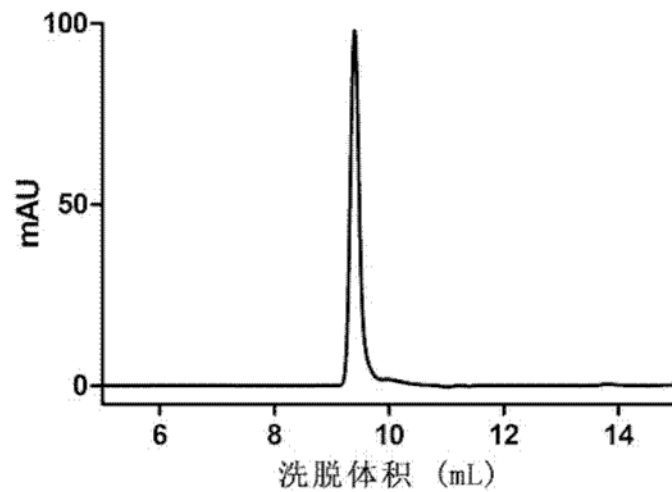


图31c

DAKTTQPNSMSVNEEEPVSIPCNHSTISGTDYIHWYRQLPSQGPEYVIHGLTSNV
 NNRRASLAI AEDRKSSTLYIHRITPNDSGTYFCAVPLAGGTSYGKLTFGKGTKLS
 VTN (SEQ ID NO: 99)

图32a

GAGISQSPRYSVKRGQDVTLRCDPISGHVSLFWYQQAPGQGPEFLTYFQNEAQ
 LDKSGLPSDRFSAERPEGSVSTLKIQSVTPSDSALYLCASSLGQAYEQYFGPGTR
 LEVD (SEQ ID NO: 100)

图32b

DAKVTQPNSLNVNEEEPVSIPCNHSTISGTDYIHWYRQLPSQGPEYVIHGLTSNV
NNGRLSLAIAEDRKSSTLYIERITPNDSGTYFCAVPLAGGTSYGKLTFGKGTKLS
VTN (SEQ ID NO: 101)

图33a

GAGISQSPRYLSVKTGQDVTLRCDPISGHVSLFWYQQAPGQGPEFLTYFQNEAQ
LDKSGLPDRFSAERPEGSVSTLKIQSVTPSDSAVYLCASSLGQAYEQYFGPGTR
LEVD (SEQ ID NO: 102)

图33b

TQLLEQSPQSMSVQESENVTIYCNSSSVFSSLQWYRQEPGEGPTLLVTVVTGGE
VKKLKRLTFQFGDARKDSSLHITRIQPNDSTYFCAVAGSQGNLIFGKGTKLSV
TN (SEQ ID NO: 103)

图34a

DGGITQSPKYSVKEGQNVTLSCEQNLNHDAMYWYRQDPGQGLRLIYSQIVN
DFQKGDIAEGYSVSREKKESFPLTITSVTKSDSALYLCASSRSSYEYFGPGTR
LEVD (SEQ ID NO: 104)

图34b

TQLVEQSPQSLNVQESENVTIYCNSSSVFSSLQWYRQEPGEGPTLLVTVVTGGE
VKKLKRLTFQFGDARKDSSLHIERIQPNDSTYFCAVAGSQGNLIFGKGTKLSV
TN (SEQ ID NO: 105)

图35a

DGGITQSPKYLSVKTGQSVTLSCEQNLNHDAMYWYRQDPGQGLRLIYSQIVN
DFQKGDIAERYSVSREKKESFPLTITSVTKSDSAVYLCASSRSSYEYFGPGTR
LEVD (SEQ ID NO: 106)

图35b

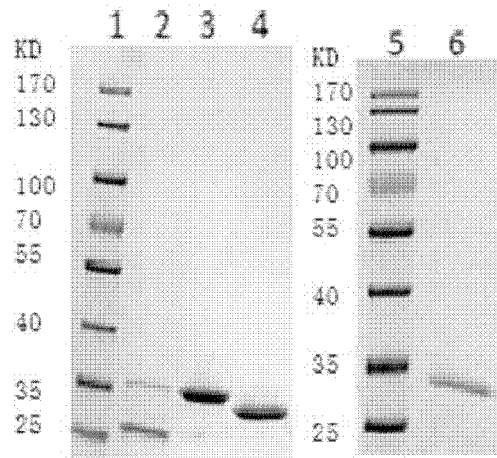


图36

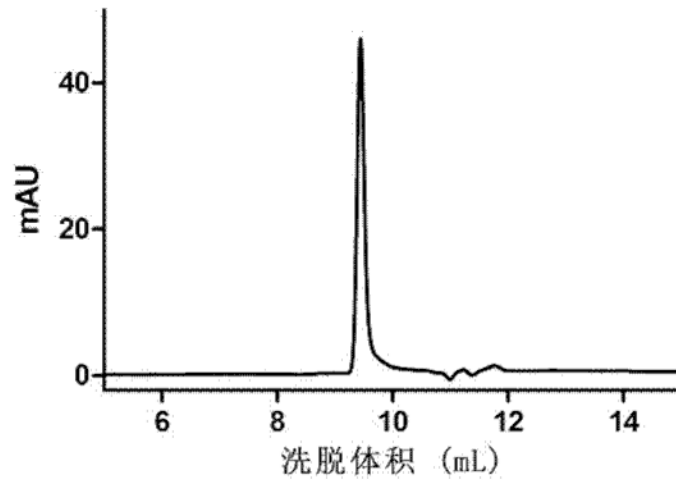


图37

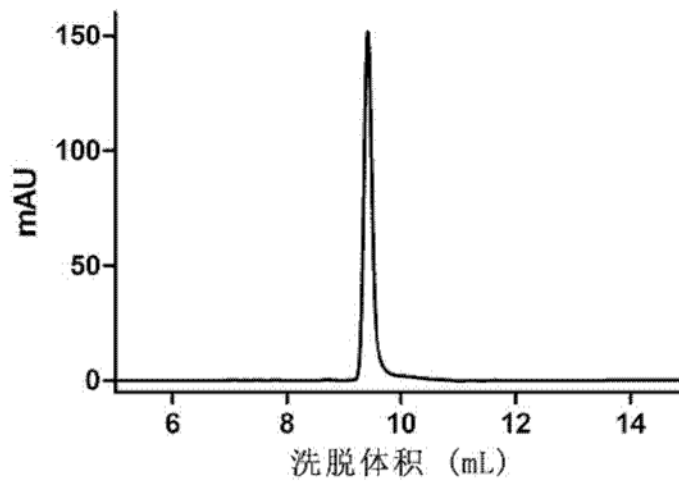


图38

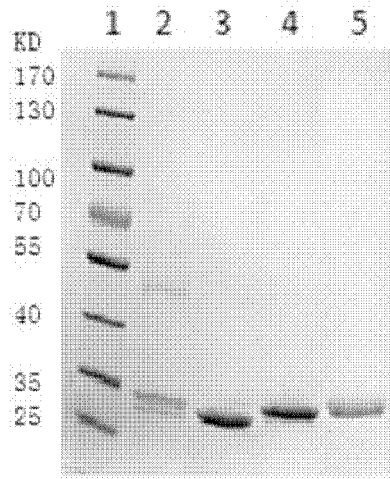


图39

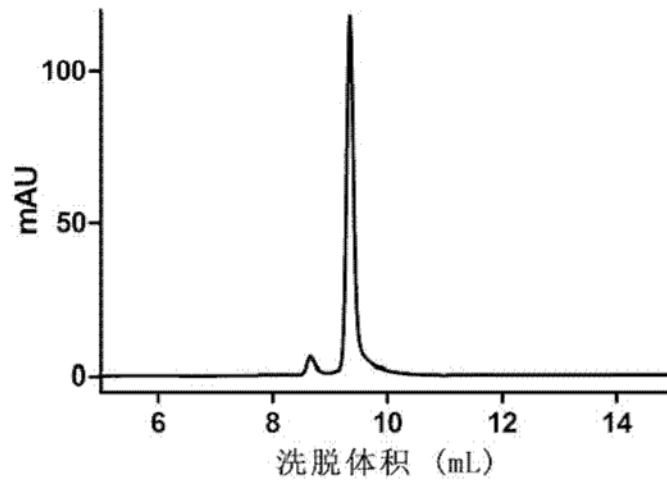


图40

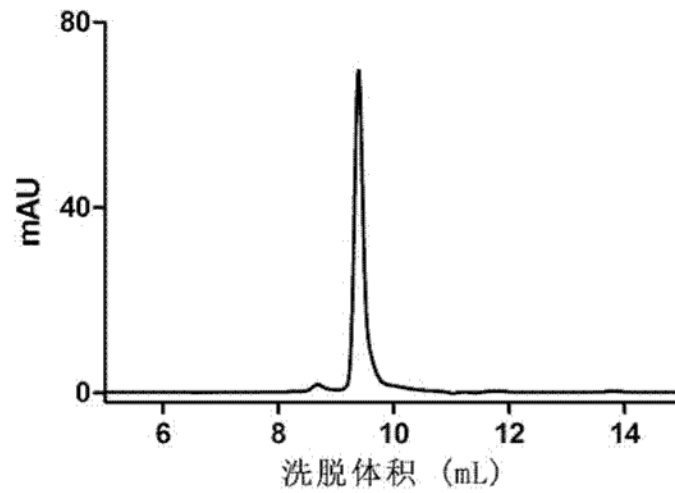


图41

DQEVTSQSPSSLNVPEGENVSINCSFTDSAIYNLQWFRQDPGKGLTSLLLVRPYQ
REQTSGRLNASLDKSSGRSTLYIERIQPNDSGTYFCAVRPGGAGSYQLTFGKGT
KLSVTD(SEQ ID NO: 107)

图42a

KAGITQTPRYLSVKTGQSVTLSCSPISGHRVSWYQQTPGQGLQFLFEYFSETQR
NKGNFPGRFSGRQFSNSRSELNIESVTPSDSALYLCASSPNMADEQYFGPGTRLE
VD(SEQ ID NO: 108)

图42b

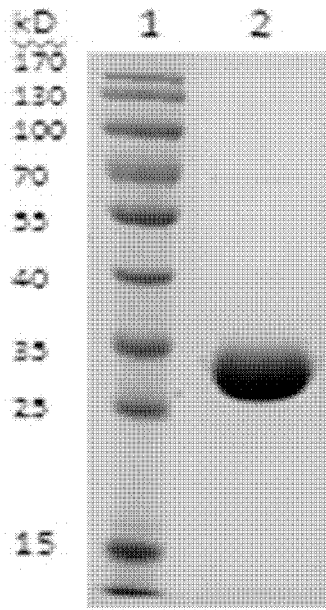


图43

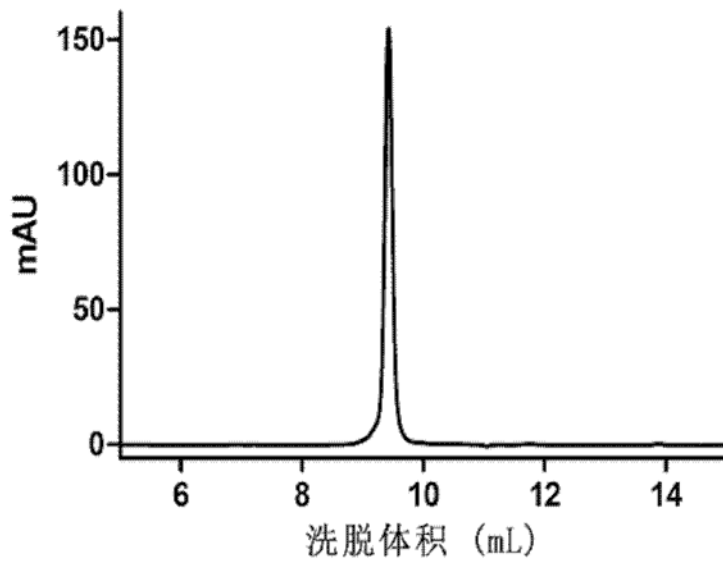


图44

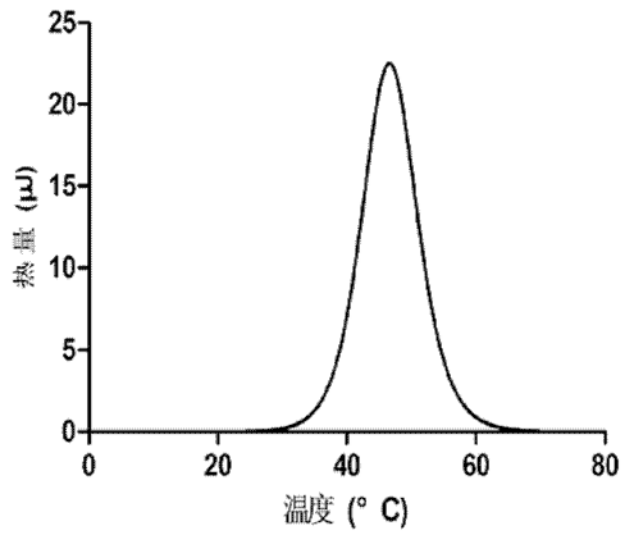


图45

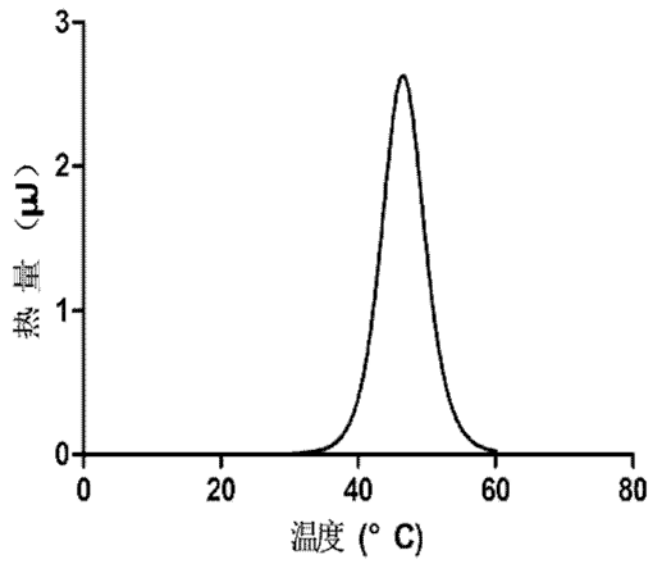


图46

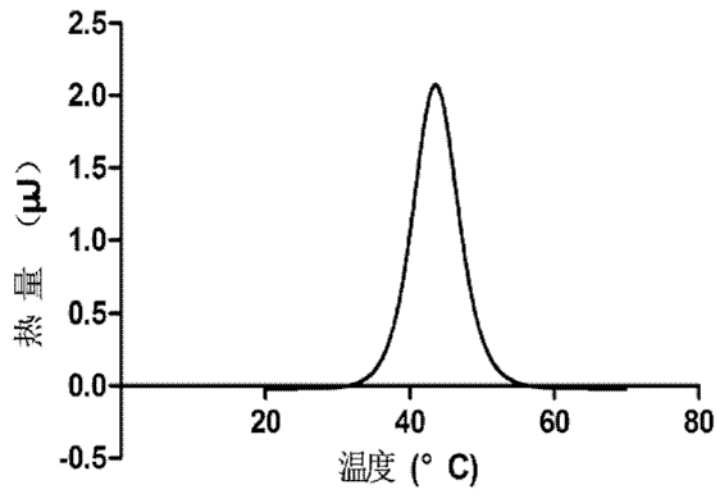


图47

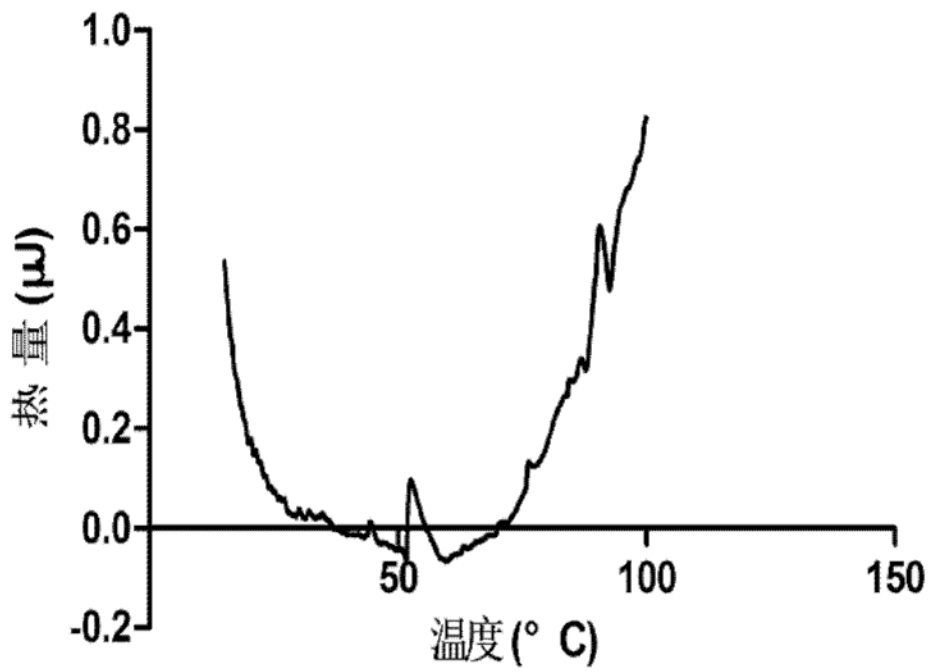


图48a

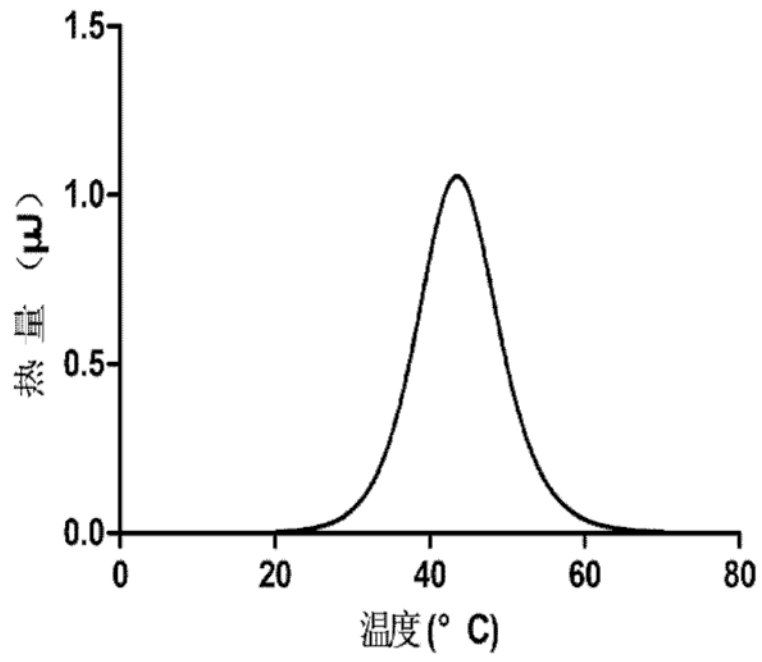


图48b

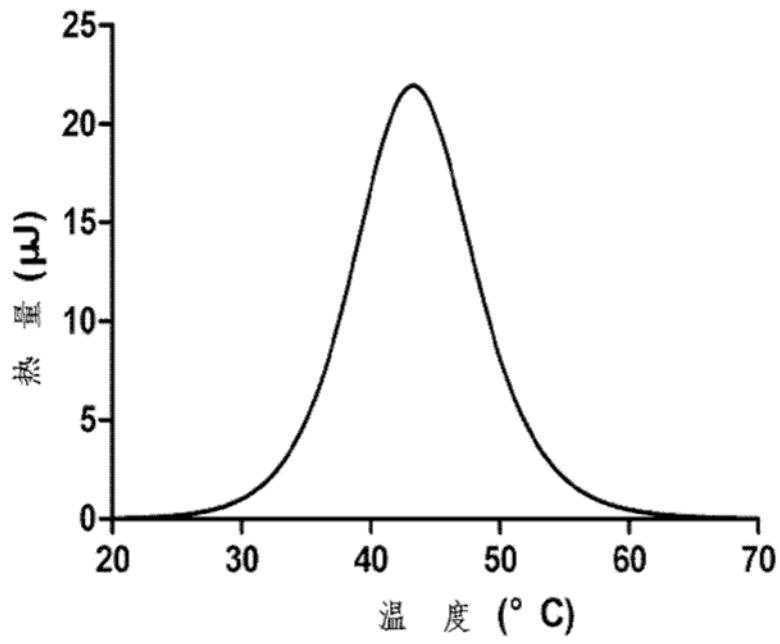


图49a

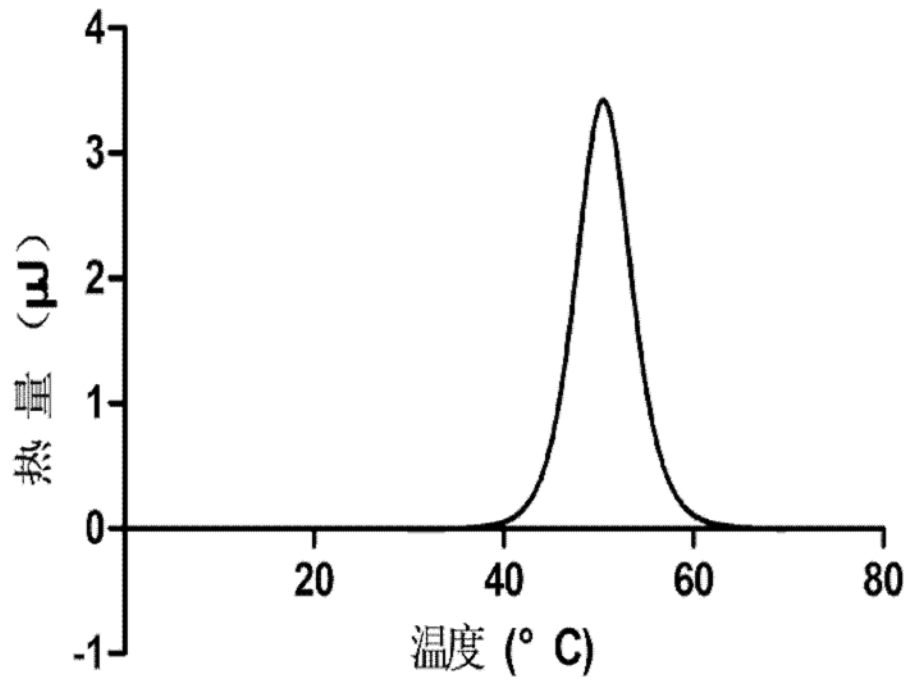


图49b